

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

ILZE MARI OLIVI GOMES

**Fosfatase de Dupla Especificidade 1 regula a fosforilação de YAP1 em células
de adenocarcinoma ductal pancreático**

**Ribeirão Preto
2020**

ILZE MARI OLIVI GOMES

Fosfatase de Dupla Especificidade 1 regula a fosforilação de YAP1 em células de adenocarcinoma ductal pancreático

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Genética

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Olivi Gomes, Ilze Mari

“Fosfatase de Dupla Especificidade 1 regula a fosforilação de YAP1 em células de adenocarcinoma ductal pancreático”

Ribeirão Preto, 2020.

65f. il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

1. Adenocarcinoma Ductal Pancreático. 2. Via de Sinalização Hippo. 3. Proteínas fosfatases de dupla especificidade. 4. DUSP1. 5. YAP1.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2015/10694-5);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ILZE MARI OLIVI GOMES

Fosfatase de Dupla Especificidade 1 regula a fosforilação de YAP1 em células de adenocarcinoma ductal pancreático

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Genética

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“O homem é livre para fazer o que quer, mas não para querer o que quer”.

Schopenhauer, 1819.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço às forças superiores que permitem e contribuem com minha evolução. Sem **Deus**, meu **povo** e meu **anjo da guarda**, eu não estaria aqui hoje;

À minha mãe, **Marilu Olivi** e a minha irmã, **Naiana Muara Olivi**, por todo o ensinamento, amor, por sempre terem acreditado em mim e me apoiado em todas as decisões edificantes;

Ao meu pai, **Marcos Tadeu**, por ter contribuído e tornado possível minha jornada acadêmica;

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Silva Silveira**, pela oportunidade e por todo o ensinamento ao longo desses anos;

À equipe do **Laboratório de Oncologia Experimental** pelo crescimento proporcionado ao longo desse mestrado. Agradeço à **Verena Santos**, **Pamela Viani**, e **Gabriela Maciel** pelas risadas, pelos confrontos edificantes, pelo amadurecimento proporcionado e pelo apoio essencial nos momentos difíceis. Agradeço, especialmente, à **Mariana Ruckert**, que tornou esse projeto possível;

Aos amigos da **Biociência 2012**, **Isabela Morato**, **Marília Menegato**, **Fernanda Mansano**, **Maria Carolina Vieira**, **Rayra Dituri**, **Jaqueline de Jorge**, **Pedro Henrique Zorzanelli** e **Gabriel Guerra** pela amizade, pela parceria atemporal, por todo amor, pelo apoio energético, pela paciência e por todos esses anos ao meu lado independente da distância. Eu tenho muita sorte de ter vocês como melhores amigos e nossa amizade é essencial na minha vida; Ainda bem que eu tenho meus amigos;

À **Rosane Queiroz** e a toda equipe do **Grupo de Pesquisa em Oncologia Molecular Pediátrica**, especialmente ao **Gustavo**, **Pablo**, **Graziella** e **Karina**, pela colaboração e ajuda ao longo de todo o mestrado;

À **Susie Nalon**, pelo acolhimento e pela ajuda prestada sempre que necessário;

Às agências de fomento **FAPESP** e **CAPES** pelo apoio financeiro.

RESUMO

Olivi-Gomes, I. M.. **“Fosfatase de Dupla Especificidade 1 regula a fosforilação de YAP1 em células de adenocarcinoma ductal pancreático”** 2020, 65f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é um tumor agressivo que representa 85% dos casos de câncer na região exócrina do pâncreas. A sobrevida livre de eventos em 5 anos é de aproximadamente 8%, sendo uma consequência do diagnóstico tardio causado pela ausência de sintomas específicos durante o desenvolvimento do ADP. A progressão tumoral do ADP é iniciada pela mutação do oncogene *KRAS* que resulta na proliferação celular desregulada e inibição da apoptose, entre outros processos tumorigênicos. Tais processos são mediados pela ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que são reguladas por fosforilação e participam do controle de inúmeras vias de transdução de sinais. Nesse contexto, as proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) atuam no controle dessas vias por *feedback* negativo das MAPKs, por meio da desfosforilação de resíduos de tirosina e treonina/serina. Essas fosfatases são descritas no ADP tanto com função oncogênica quanto com função supressora de tumor, dependendo do contexto. Além das vias MAPKs, a via de sinalização Hippo desempenha papel essencial na iniciação, progressão e recorrência do ADP e também é controlada por fosforilação. A proteína YAP1 é a molécula efetora dessa via e sua atividade depende da presença ou ausência de moléculas de fosfato em resíduos de serina. Em vista do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar interação entre DUSPs e a via de sinalização Hippo em linhagem celular de ADP. Avanálise *in silico* de enriquecimento funcional (GSEA) primeiramente apontou a DUSP6 como potencial reguladora da via Hippo. A inibição farmacológica de DUSP6 com o composto BCI ocasionou o aumento nos níveis de P-YAP1 na linhagem MIA PaCa-2, mas não afetou significativamente os níveis de P-YAP1 na linhagem PANC-1. No entanto, a indução da expressão de *DUSP6* não reduziu os níveis de P-YAP1 na linhagem MIA PaCa-2. Dado que o composto BCI é também um inibidor de DUSP1, foi

realizado um *knockout* gênico específico de *DUSP1* por CRISPR/Cas9 na linhagem MIA PaCa-2, no qual foi observado um aumento dos níveis de fosforilação de YAP1. A análise de *Docking in silico* demonstrou que a interação entre DUSP1 e YAP1 é viável e forma um complexo estável pelo resíduo de serina127 da molécula efetora da via Hippo. A análise de expressão gênica revelou uma redução na expressão do gene alvo de YAP1, o *CTGF*, na linhagem MIA PaCa-2 com *knockout* de DUSP1. Em suma, os dados obtidos nesse estudo apontam, pela primeira vez na literatura, para a interação entre DUSP1 e YAP1 em ADP. Esse resultado contribui com uma melhor compreensão dos processos de iniciação, progressão, resistência e recorrência do ADP, visto que YAP1 e DUSP1 são agentes essenciais desses fenótipos.

Palavras-chave: Adenocarcinoma Ductal Pancreático, Via de Sinalização Hippo, Proteínas fosfatases de dupla especificidade, DUSP1, YAP1.

ABSTRACT

Olivi Gomes, I. M. **“Dual Specificity Phosphatase 1 regulates YAP1 phosphorylation in pancreatic ductal adenocarcinoma.”** 2020, 65p.
Master’s Degree Dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

The Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is an aggressive tumor that represents 85% of the cancers in the pancreas’ exocrine region. The 5-year overall survival is about 8%, which is a consequence of late diagnosis, which, in turn, is a result of the lack of specific symptoms. The PDAC’s tumor progression is triggered by the KRAS oncogene mutation, which results in uncontrolled cell proliferation and apoptosis inhibition among other tumorigenic processes. These phenotypes are mediated by the activation of the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), which in turn are regulated by phosphorylation and participate in the control of countless transduction pathways. The Dual Specificity Phosphatases control MAPKs through negative feedback by dephosphorylating tyrosine and threonine/serine residues. These phosphatases are described in PDAC with oncogenes or tumor suppressor roles, depending on the context. Besides MAPKs pathways, the Hippo signaling pathway plays an essential role in the PDAC initiation, progression, and recurrence, and it is also regulated by phosphorylation. The protein YAP1 is the effector molecule of this pathway and its activity is controlled by the presence or absence of a phosphate molecule at serine residues. Hence, this study aimed to investigate the interaction between DUSPs and the Hippo Signaling pathway in PDAC cell lines. *In silico* analysis of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) first pointed out DUSP6 as a possible regulator of the Hippo signaling pathway. Pharmacological inhibition of DUSP6 with BCI led to an increase in P-YAP1 levels in the MIA PaCa-2 cell line, although it did not affect P-YAP1 levels in PANC-1 cell line. Conversely, the induction of *DUSP6* expression did not affect P-YAP1 levels in the MIA PaCa-2 cell line. The specific knockout of DUSP1 by CRISPR/Cas9 in the MIA PaCa-2 cell line increased the phosphorylation levels of YAP1. *In silico* docking demonstrated that DUSP1 and YAP1 interact at Ser127 of the Hippo’s effector molecule and the complex of these two proteins is stable. Also, Real-Time qPCR revealed a

reduction of *CTGF* expression in the *DUSP1* knockout MIA PaCa-2 cell line. Taken together, our data point out for the first time in the literature, to a interaction between DUSP1 and YAP1 in the MIA PaCa-2 cell line. This result leads to a better understanding of PDAC initiation, progression, resistance and recurrence since YAP1 and DUSP1 are essentials agents of these phenotypes.

Key words: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Hippo Signaling Pathway, Dual-Specificity Phosphatase, DUSP1, YAP1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do mecanismo de ação da Via de Sinalização Hippo.....	29
Figura 2. Fluxograma de atividades.....	30
Figura 3: Análise <i>in silico</i> (GSEA) entre DUSPs e processos celulares.....	55
Figura 4. Expressão de P-YAP1, YAP1 e Vinculina na linhagem MIA PaCa-2 tratada com BCI nos tempos de 2, 6 e 24 horas.....	56
Figura 5: Expressão de P-YAP1, YAP1 e Vinculina na linhagem PANC-1 tratada com BCI.....	57
Figura 6: Representação da análise proteica de P-YAP1, YAP1, DUSP6, e Vinculina na linhagens MIA PaCa-2 pLX304 WT e MIA PaCa-2 pLX304-DUSP6.....	58
Figura 7: Representação da análise proteica de P-YAP1, YAP1, DUSP1, e β -actina nas linhagens MIA PaCa-2 WT e MIA PaCa-2 K.O DUSP1.....	59
Figura 8: Docking entre as proteínas DUSP1 e YAP1.....	60
Figura 9: Análise <i>in silico</i> da correlação entre DUSP1 e genes alvos de YAP1.....	61
Figura 10: Análise da expressão gênica de alvos de YAP1 nas linhagens MIA PaCa-2 WT e MIA PaCa-2 K.O DUSP1.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Identificação da sequência do crRNAs utilizado para a edição gênica da DUSP1, sequência PAM, localização genômica e o código de acesso da sequência.....	32
Tabela II. Valores de IC50 de BCI determinados para PANC-1 e MIA PaCa-2.....	33
Tabela III. Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizados para análise de expressão gênica.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
BCI	(E)-2-benzilideno-3-(ciclo-hexilamino)-2,3-di-hidro-1H-inden-1-ona
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CYR61	Indutor angiogênico rico em cisteína 61
CO ₂	Dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultivo celular)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DUSPs	Proteína fosfatase de dupla especificidade
EMT	Transição epitélio mesenquimal
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
JNK	c-Jun quinases N-terminais
LATS1/2	Proteína grande supressora de tumor 1/2
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MST1/2	Macrófago estimulante 1 e 2
NIP	Neoplasia intraductal pancreática
p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PBS	Tampão fosfato salino
PTPs	Proteínas tirosino fosfatases
RIPA	Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SBF	Soro fetal bovino
TAZ	Proteína Taffazin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TBST	Tampão Tris-salino acrescido de Tween 20
YAP1	Proteína Associada a Yes-1

SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Adenocarcinoma Ductal Pancreático (ADP)	22
1.2 Importantes vias de sinalização na progressão tumoral do ADP	24
1.3 Proteínas Tirosina Fosfatases	26
1.4 Via de sinalização Hippo	28
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Análises <i>in silico</i>	30
3.1.2 <i>Docking</i>	30
3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo	31
3.3 Modulação gênica de <i>DUSP1</i> e <i>DUSP6</i>	31
3.4 Ensaio de Citotoxicidade do composto BCI – IC ₅₀	32
3.5 Extração proteica	33
3.6 Análise da expressão proteica	33
3.7 Extração de RNA total.....	34
3.8 Síntese de cDNA e análise de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	34
3.9 Análises estatísticas	35
RESULTADOS.....	41
4. RESULTADOS.....	55
4.1 <i>DUSP6</i> , <i>DUSP7</i> , <i>DUSP10</i> e <i>DUSP14</i> apresentam correlação com a via de sinalização Hippo.....	55

4.2 MIA PaCa-2 apresenta aumento na fosforilação de YAP1 em resposta ao tratamento com BCI.....	55
4.3 A indução da expressão de DUSP6 aumenta a fosforilação de YAP1	57
4.4 DUSP1 é responsável pela modulação de P-YAP1 em MIA PaCa-2	58
4.5 DUSP1 e YAP1 formam um complexo estável <i>in silico</i>	59
4.6 A inibição de <i>DUSP1</i> modula alvo <i>downstream</i> de YAP1	60
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP)

O pâncreas é um órgão do sistema digestivo caracterizado como glândula mista e sua estrutura anatômica consiste em cabeça, corpo e cauda (A. D. Rhim & Stanger, 2010). Responsável por regular a digestão e o metabolismo de glicose, esse órgão possui dois compartimentos com funções distintas, a função endócrina e a função exócrina (A. Rhim, 2011). A capacidade do pâncreas em produzir enzimas digestivas é reconhecida como a função exócrina do órgão (Bardeesy & DePinho, 2002). A função endócrina é desempenhada pelas ilhotas de Langerhans que produzem e secretam os hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídio pancreático, atuando na homeostase metabólica (Bardeesy & DePinho, 2002). O pâncreas pode ser acometido por tumores tanto na região endócrina quanto na exócrina, embora os tumores endócrinos sejam incomuns (A. Rhim, 2011). Dentre as neoplasias que acometem a região exócrina do pâncreas, destaca-se o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) que representa 85% dos casos de tumores dessa região (Bardeesy & DePinho, 2002).

Existem diversas lesões estabelecidas como precursoras de ADP, sendo as mais estudadas: neoplasia mucinosa cística (NMC), neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI) e neoplasia intraepitelial pancreática (NIP), que representa a lesão precursora mais comum (Noë & Brosens, 2016). Dentre suas características, a NIP destaca-se por ser microscópica e assintomática, o que impede sua detecção por meio de procedimentos não-invasivos de imagem, diminuindo a possibilidade do diagnóstico precoce (Distler et al., 2014; Hruban et al., 2004). A progressão dessa lesão é causada pelo acúmulo de alterações genéticas que caracterizam seus estágios, iniciando em NIP-1 (NIP-1A e NIP-1B) e seguido por NIP-2 e NIP-3, até o desenvolvimento do tumor *in situ* (Noë & Brosens, 2016). Estima-se que o processo de desenvolvimento do ADP, desde às primeiras lesões precursoras até o estado metastático, pode demorar, pelo menos, 20 anos (Yachida, Shinichi; et al., 2010).

O ADP origina-se a partir da alteração neoplásica de células do ducto epitelial do pâncreas causada pela mutação inicial no gene *KRAS* e seguida pelo acúmulo de mutações em genes supressores tumorais (Bardeesy & DePinho, 2002). Dentre as principais mutações necessárias para a progressão tumoral, destacam-se as que acometem os genes *TP53*, *CDKN2A* e *SMAD4* (Raphael et al., 2017). Sendo um tumor no qual a estimativa de sobrevida em 5 anos não ultrapassa 8%, o ADP apresenta

uma taxa de mortalidade praticamente igual à sua taxa de incidência (Siegel et al., 2018). Apenas 10% dos pacientes desenvolvem ADP antes dos 50 anos e, a partir dos 80 anos, a incidência aumenta exponencialmente, elevando em cerca de 40 vezes a propensão ao desenvolvimento do ADP (Bardeesy & DePinho, 2002; Lowenfels & Maisonneuve, 2006). No Brasil, 10/100.000 habitantes desenvolvem ADP entre 40 e 50 anos e, aos 80 anos, esse número aumenta para 116/100.000 habitantes (Silva, 2018). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, 2% dos cânceres diagnosticados e 4% das mortes no Brasil por câncer são correspondentes ao ADP (INCA, 2020). Nos Estados Unidos, somente no ano de 2019 foram registradas 56.700 mortes por câncer de pâncreas e mais de 57.600 mil mortes estão previstas para o ano de 2020 (Siegel et al., 2019, 2020). O tabagismo é um fator de risco não-hereditário determinante no desenvolvimento ADP, aumentando as chances em 1,8 vezes quando comparado a não fumantes (Villeneuve, PJ; et al., 2000). Além do tabagismo, o metabolismo anormal de glicose e o histórico familiar também exercem elevado risco no desenvolvimento desse tumor (Edalat, 2012; Klein et al., 2004).

Atualmente, o único método potencialmente curativo para o ADP consiste na ressecção cirúrgica. Entretanto, aproximadamente 80% dos pacientes são diagnosticados em estágio avançado, o que resulta em um prognóstico frequentemente desfavorável (Vincent et al., 2011). Dentre as alternativas terapêuticas disponíveis, a gemcitabina tem sido o quimioterápico de escolha nos últimos 23 anos (Cancer & Watanabe, 1995). Esse composto é um análogo de nucleotídeo que, após modificações por fosforilação, é internalizado no núcleo celular e incorporado ao DNA, ocasionando o término precoce da replicação do DNA (De Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014). A terapia com gemcitabina aumenta a sobrevida global dos pacientes em apenas 6,8 meses, devido, principalmente, à ocorrência de mecanismos e intrínsecos ou adquiridos de quimioresistência (Conroy et al., 2011; De Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014). Em busca de alternativas terapêuticas, a gemcitabina é geralmente utilizada em regimes de poli-quimioterapia, tendo como exemplo sua associação à cisplatina (Agop Philip, 2002; Ouyang et al., 2016). Embora alguns trabalhos relatem um aumento significativo na sobrevida global com a combinação de cisplatina e gemcitabina, um estudo de meta-análise, que avaliou nove ensaios clínicos aleatórios, não encontrou diferença significativa dessa associação na sobrevida geral e na taxa de sobrevida global em 1 ano (Agop Philip, 2002; Colucci et al., 2002; D. Huang et al., 2016).

Em 2005, Conroy e colaboradores sugeriram, pela primeira vez, a combinação de 4 substâncias (Irinotecano, Oxaliplatina, Leucovorin e Fluorouracil) para o tratamento de ADP em estado avançado (Conroy et al., 2005). Esse protocolo, conhecido como FOLFIRINOX, elevou a sobrevida global dos pacientes de ADP para 11,1 meses, em comparação aos 6,8 meses obtidos com o uso da gemcitabina (Conroy et al., 2011). Embora existam diversas evidências de que o FOLFIRINOX aumente a sobrevida global de pacientes com ADP, esse protocolo apresenta níveis altos de toxicidade, o que inviabiliza o seu uso em pacientes com alto grau de comorbidades (Peddi et al., 2012).

Além do modesto aumento na sobrevida dos pacientes frente ao tratamento com os atuais agentes quimioterápicos, o ADP conta com mecanismos bem desenvolvidos para adquirir resistência a fármacos, ocasionando a reincidência do tumor. Considerando que o ADP apresenta resistência aos múltiplos tipos de tratamento disponíveis, tais como quimioterapia, radioterapia e terapia alvo direcionada, o uso de tratamento paliativo é frequente (Kleeff et al., 2016). Em um cenário no qual mais de 80% de pacientes não têm a opção de realizar ressecção cirúrgica, devido ao estágio de progressão tumoral no momento do diagnóstico, é evidente a necessidade pela busca por novos alvos moleculares que possibilitem o desenvolvimento de terapias alternativas.

1.2. Importantes vias de sinalização na progressão tumoral do ADP

Como citado anteriormente, a tumorigênese do ADP inicia-se com a mutação no oncogene *KRAS*, codificante da proteína RAS, a qual é uma GTPase que modula diversas vias de transdução de sinais altamente conservadas (Margolis, Ben; Skolnik, 1994). As vias reguladas por essa proteína atuam em diversos fatores de transcrição, resultando na alteração de processos celulares como proliferação, sobrevivência celular, apoptose, migração, metabolismo, entre outros (McCubrey et al., 2007). Em condições normais, a proteína RAS, em seu estado inativo, está associada a uma molécula de GDP. Sinais extracelulares estimulam a trans-autofosforilação de receptores tirosino-quinases da membrana citoplasmática, tornando-os sítios de reconhecimento para proteínas GrB2. Por sua vez, as proteínas GrB2 recrutam a molécula SOS, e o complexo GrB2-SOS acarreta na substituição da molécula GDP, por uma molécula GTP. A associação de RAS à molécula GTP altera sua conformação proteica, tornando-se livre da membrana celular e capaz de regular diversas vias de

transdução de sinais como ERK, JNK, p38, dentre outras (Margolis, Ben; Skolnik, 1994).

As mutações de ponto em RAS podem acometer os resíduos G12, G13 e G16 da proteína (Bryant et al., 2014). Das mutações em *KRAS* no ADP, 98% ocorrem no resíduo 12, resultando na substituição do códon GGT (codificante de Glicina) para o códon GAT (ácido aspártico) (Bryant et al., 2014). Essa mutação aumenta a afinidade de RAS por GTP, acarreta na ativação constitutiva da proteína, e resulta na ativação de moléculas *downstream* mesmo na ausência sinalização extracelular (Bryant et al., 2014).

Uma das consequências da ativação constitutiva de RAS é a ativação da via RAS/RAF/MEK/ERK que atua na proliferação celular e, em conjunto com a via PI3K, controla a mobilidade e a sobrevivência celular (Whitmarsh et al., 1998). Por controlar esses importantes processos celulares, a via RAS/RAF/MEK/ERK é constantemente alterada em tumores, podendo, inclusive, ser ativada indiretamente por meio de translocações cromossômicas, como t(9,22), e/ou hiperexpressão de receptores como, por exemplo, o EGFR (Li et al., 2016; McCubrey et al., 2007). You e colaboradores demonstraram, ao inibir ERK em lesões intraepiteliais, que essa molécula é essencial para o estabelecimento do ADP por meio da promoção de inflamação, proliferação celular e inibição da apoptose (L. You et al., 2016).

A mutação na proteína RAS afeta a modulação da angiogênese e da proliferação celular em ADP por meio da ativação da via JNK, a qual, em condições normais, tem como função induzir morte celular por apoptose, além de inibir vias responsáveis pela sobrevivência celular (Sato et al., 2017; Xia et al., 1995). Sendo ativada por sinais de estresse, inflamação, infecção, estresse oxidativo e dano ao DNA, a via JNK ativa o fator de transcrição c-Jun, que levará a transcrição de genes pró-apoptótico, *FOS*, *JUN*, além da produção de citocinas inflamatórias (Zeke et al., 2016). O impacto de JNK no ADP foi demonstrado por Sato e colaboradores ao inibirem essa quinase em camundongos geneticamente modificados, o que resultou em tumores menores quando comparados com camundongos sem a inibição de *JNK* (Sato et al., 2017).

Paralelamente à via JNK, a ativação constitutiva de RAS também altera o controle da via p38 que, por sua vez, é ativada principalmente por células imunes e citocinas inflamatórias (J. Han et al, 1994; Shapiro & Dinarello, 1995). A proteína p38, em modelo xenográfico de camundongo, contribui com a progressão tumoral do ADP por meio da produção de citocinas e pela modulação da resposta inflamatória tumoral

(Alam et al., 2015). No entanto, pacientes em quimioterapia com gemcitabina e 5-FU, e que apresentavam alta expressão de p38, exibiam sobrevida superior aos pacientes com baixa expressão de p38 (Zhong et al., 2014). No mesmo estudo, Zhong demonstrou, em linhagens celulares pancreáticas, que a elevada expressão de p38 corresponde a baixos níveis de JNK.

Em suma, influência exercida pelas MAPKs no contexto ADP torna compreensível a busca por inibidores específicos que resultariam na desestabilização dessas vias, com conseqüente impacto na progressão tumoral. No entanto, a progressão tumoral do ADP tem como característica a capacidade de induzir a ativação dessas vias por meios não-canônicos, adquirindo, assim, resistência aos inibidores específicos (Hayes, Tikvah K; et al., 2017; Messina et al., 2011). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos de controle por *feedback* negativo das vias acima descritas torna-se uma alternativa frente ao cenário desfavorável dos inibidores específicos de MAPKs no tratamento de ADP.

1.3. Proteínas tirosina fosfatases

Considerando que o processo de fosforilação resulta na alteração reversível da conformação e da atividade proteica, nota-se a importância de se compreender o processo reverso, a desfosforilação, e como a manutenção desse processo ocorre. Enzimas capazes de remover resíduos de fosfato de outras moléculas são conhecidas como fosfatases. Nessa ampla categoria, destacam-se as proteínas tirosina fosfatases (PTPs), que fazem parte de um grande grupo conhecido como PTPoma. As PTPs têm o sítio catalítico composto por cinco aminoácidos entre resíduos de cisteína e arginina. Dessa forma, o PTPoma pode ser subdividido de acordo com os aminoácidos presentes no domínio catalítico, resultando em três subclassificações. Essas subclasses são conhecidas como *Asp-based*, *His-based* e *Cys-based*, sendo que o último o grupo apresenta o maior número de membros (Andres Alonso et al., 2004). Diversos subgrupos são originários do *Cys-based*, tais como: PTPs clássicas, fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) *VH1-like*, *Paladin*, INPP4s, TMEM55s e SAC fosfatases. Esses grupos são novamente subdivididos de acordo com a especificidade por substratos, além da presença ou ausência de região transmembranar (Andres Alonso et al., 2004; Ruckert et al., 2019).

Nesse trabalho, destacamos as DUSPs, que têm como principal característica a capacidade de desfosforilar simultaneamente tanto resíduos de tirosina quanto de

serina/treonina (Denu & Dixont, 1998). Essa família de fosfatases possui 64 membros que compartilham a presença de uma extremidade catalítica –COOH conservada e um domínio N-terminal não catalítico, menos conservado, responsável pela localização subcelular, pelo reconhecimento e associação ao substrato (Andrés Alonso & Pulido, 2016; Braschi et al., 2019; Patterson et al., 2010). As DUSPs podem ser subdivididas em três categorias, sendo elas: nucleares, citoplasmáticas e induzíveis (Bermudez et al., 2010). Pontua-se também outra subdivisão das DUSPs baseada na presença ou ausência do domínio MKB, que possui os aminoácidos necessários para a interação com MAPKs (Denu & Dixont, 1998; Patterson et al., 2010). Nesse âmbito, são denominadas DUSPs típicas aquelas que contêm o domínio específico de ligação MAPK e as fosfatases que não possuem esse domínio são denominadas DUSPs atípicas (Patterson et al., 2010). Visto que as DUSPs atuam na modulação de numerosas vias de sinalização, lista-se como processos regulados por essas fosfatase a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, resposta imune adaptativa, homeostase metabólica, dentre outras (Clark et al., 2007; Maillet et al., 2008; J. J. Wu et al., 2006; W. Wu et al., 2005).

A manutenção desses processos celulares ocorre mediante à interação entre as DUSPs e as MAPKs efetoras das vias anteriormente citadas. Nessas circunstâncias, tem-se descrita a regulação de ERK1/2 por *feedback* negativo exercido pelas DUSP1, DUSP2, DUSP5, DUSP6 e DUSP9 (Sun et al., 1993; Y. Liu et al., 2007; S. C. Lin et al., 2011; Z. Zhang et al., 2010). Enquanto a DUSP6 regula ERK1/2 no citoplasma, a DUSP5 atua na regulação de ERK1/2 no núcleo, e ambas apresentam capacidade de ancorar ERK1/2 (Maillet et al., 2008; Mandl et al., 2005).

As proteínas fosfatases também regulam a inativação da via JNK. Nesse âmbito, tem-se descrito como reguladoras de JNK as DUSP1, DUSP2, DUSP8 e DUSP9 (Ruckert et al., 2019). A DUSP1 atua na inativação de JNK e p38, inibindo a morte celular por apoptose. Em ADP, o composto gemcitabina age na ativação das vias JNK e p38. Nesse contexto, o *knockout* de *DUSP1* resulta no aumento da sensibilidade do ADP a esse tratamento (Liu et al., 2014). Com relação à MAPK p38, sua regulação por DUSPs também é descrita na literatura, destacando as fosfatases DUSP1, DUSP6, DUSP9 e DUSP28 (Dickinson et al., 2002; Farooq & Zhou, 2004; Kidger & Keyse, 2016; Wang et al., 2014).

Considerando que as DUSPs regulam processos celulares essenciais, torna-se intuitivo questionar a atuação dessas fosfatases no contexto tumoral. As DUSPs já

foram descritas tanto como oncogenes quanto como supressoras de tumor, de maneira contexto-dependente. Dentre as DUSPs já descritas pela literatura científica, as DUSPs 1, 2, 7 e 28 são descritas com função oncogênica em tumores de próstata, ovário, glioblastoma e pancreático (Ruckert et al., 2019). Quanto à função supressora de tumor, tem-se descrito na literatura as DUSPs 5, 6 e 9 como fosfatases supressoras de tumor, embora possam apresentar função de oncogene dependendo do contexto tumoral (Ruckert et al., 2019).

A compreensão da ampla atuação das DUSPs em importantes vias de sinalização do ADP torna-se essencial para elucidar os mecanismos de progressão tumoral do ADP e ampliar a identificação de possíveis marcadores, seja de prognóstico ou de alvos terapêuticos. Além das vias citadas, diversas outras vias importantes na tumorigênese e progressão tumoral também são controladas por fosforilação. Nesse cenário, a via de sinalização Hippo tem sido extensivamente investigada e representa uma das principais vias oncogênicas do ADP, como será descrito abaixo.

1.4. Via de sinalização Hippo

A via Hippo é extensivamente estudada em virtude de sua atuação na supressão da proliferação celular, controle do tamanho de órgãos, regeneração tecidual, função das células tronco e na resposta imune (Camargo et al., 2007; Murakami et al., 2017; Ramos & Camargo, 2012). Os mecanismos de ativação e inativação dessa via acontecem por meio da localização celular de um dos principais efetores desse processo, o ativador transcricional associado a proteína Yes (YAP1) (J. Huang et al., 2005).

A ativação da via Hippo pode ocorrer em resposta a múltiplos mecanismos de sinalização, tais como por proteínas atuantes na polaridade e adesão celular, alteração na tensão mecânica pelo contato célula-célula, além de fatores de transcrição como as proteínas quinases TAOs e as MAPKs (Boggiano, Julian C., et al., 2011). Os estímulos de ativação dessa via resultam na dimerização e ativação das quinases MST1/2 pelo processo de autofosforilação, que, em seguida, forma um complexo com a proteína Salvador 1 (Sav1) (PRASKOVA et al., 2004; Glantschnig et al., 2002). Por sua vez, o complexo MST1/2-Sav1 fosforila a proteína grande supressora de tumor 1/2 (LATS1/2) e a proteína ativadora MOB quinases (MOB1A e MOB1B), acarretando na complexação das proteínas então ativadas (Callus et al.,

2006). Em seguida, YAP1 e o co-ativador ligante à proteína PDZ (TAZ) são inativados pela fosforilação efetuada pelo complexo LATS1/2-MOB1 (Zhao et al., 2007). As fosforilações resultam na translocação desses efetores, YAP1 e TAZ, para o citoplasma celular, resultando na retenção citoplasmática ou degradação por ubiquitinação, dependendo do resíduo de serina fosforilado (Meng et al., 2016).

Quando a via Hippo está inativa, as proteínas YAP1 e TAZ são desfosforiladas e translocadas para núcleo celular. Adiante, YAP1 e TAZ, em conjugação com o fator de transcrição TEAD, ligam-se ao DNA e ativam a transcrição de diversos genes como *CTGF*, *CYR61* e *ANKRD1*, induzindo processos como proliferação e diferenciação celular (Camargo et al., 2007; F. X. Yu et al., 2013; Moroishi et al., 2015; Zhao et al., 2008) .

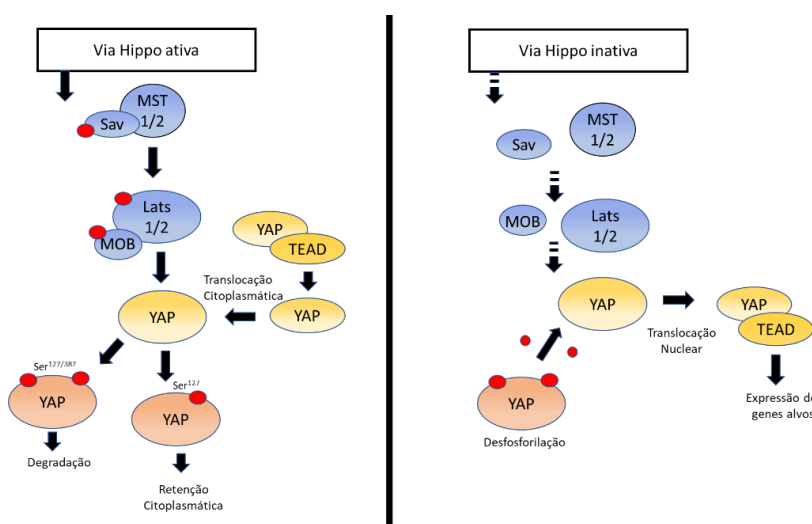


Figura 1. Representação do mecanismo de ação da Via de Sinalização Hippo. Ao lado esquerdo, mecanismo de ativação da via e conseqüente inibição de YAP1. Ao lado direito, a via Hippo inativada e a conseqüente ativação de YAP1 seguida pela sua translocação. Adaptado de Enrique Rozengurt (2018).

No ADP, o papel crucial de YAP1 como biomarcador é amplamente descrito na literatura. Como exemplo, Wei e colaboradores demonstraram, em amostras provenientes de pacientes, que YAP1 interage com o fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) podendo resultar na indução da transição epitélio-mesênquimal (EMT) e no remodelamento do microambiente tumoral. No mesmo estudo, a depleção de uma dessas moléculas resultou na inibição da capacidade de invasão de ADP (Wei et al., 2017). Em outro estudo, a inibição de YAP1 por siRNAs demonstrou que YAP1 participa do processo de crescimento independente de ancoragem, assim como na proliferação celular (Diep et al., 2012).

No âmbito do microambiente tumoral, Lee e colaboradores demonstraram que

YAP1 é ativado em resposta aos sinais resultantes da modulação do estroma frente à secreção de TG2 pelas células de ADP (Lee, et al. 2015). Não somente, destaca-se que, nesse contexto, que a proteína YAP1 pode ser um alvo *downstream* da via de sinalização RAS, resultando na progressão tumoral e estabelecimento do carcinoma invasivo (Zhang et al., 2014). Com relação a supressão imunológica existente no ADP, Murakami e colaboradores demonstraram, por meio do *knockout* do gene *YAP1* em camundongos geneticamente modificados, que essa proteína impede a reprogramação de macrófagos, a reativação das células T e a indução de apoptose (Murakami et al., 2017).

Uma vez que a via Hippo é uma das principais vias relacionadas à tumorigênese em ADP, e que YAP1 é um clássico marcador de prognóstico nesse tumor, investigar os mecanismos de regulação dessa via contribuirá com a melhor compreensão da progressão tumoral do ADP. Considerando que a ativação da proteína YAP1 é dependente do estado de fosforilação de resíduos de serina e que as DUSPs são capazes de efetuar a desfosforilação desse tipo de resíduo, a hipótese desse trabalho é que a atividade de YAP1 pode ser regulada pela ação de DUSPs no contexto do adenocarcinoma ductal pancreático.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel de fosfatases de dupla especificidade na modulação da via de sinalização Hippo em modelos celulares de adenocarcinoma ductal pancreático.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar *in silico* a correlação entre a expressão gênica das DUSPs típicas e dos genes regulados pela via Hippo em dados disponibilizados em plataformas públicas;
- Avaliar o impacto da modulação de DUSPs na fosforilação de YAP1 em modelos celulares de ADP *in vitro*;
- Determinar *in silico* a capacidade e estabilidade da interação entre o sítio ativo das DUSPs e os resíduos de serina de YAP1;
- Determinar o impacto da modulação da expressão gênica de DUSPs na expressão gênica dos principais alvos de YAP1.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental, no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), de acordo com o fluxograma apresentado na figura abaixo (Figura 2).

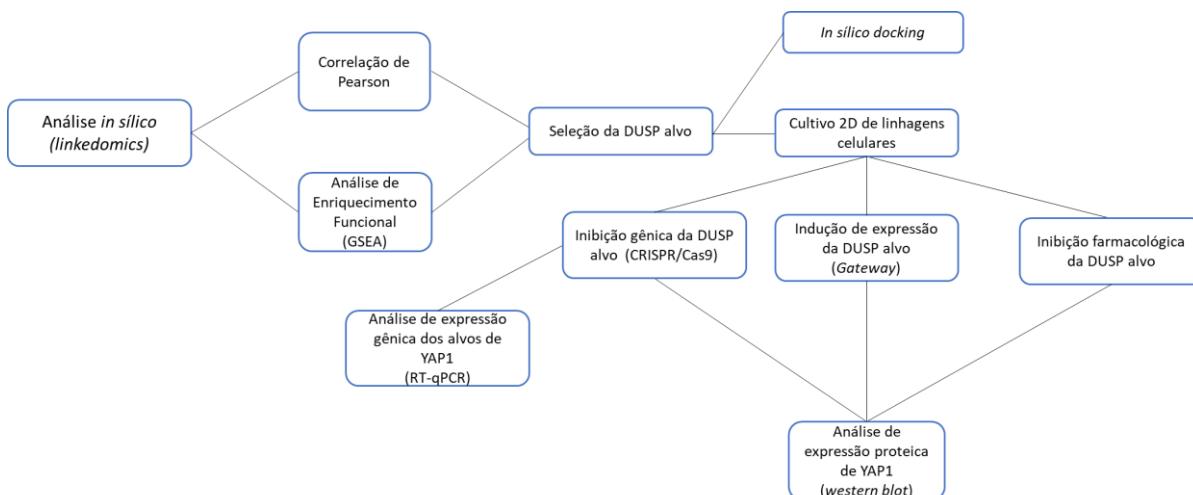


Figura 2. Fluxograma de atividades.

3.1 Análises *in silico*

3.1.1 Análise de enriquecimento funcional de genes e correlação de Pearson

Dados públicos de RNASeq de 178 amostras de ADP pertencentes ao banco de dados TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>) foram analisados por meio da plataforma *Linkedomics* (Vasaikar, S. et al., 2017). Para as análises de correlação gênica foi utilizada a correlação de Pearson. Para a análise de enriquecimento funcional, utilizou-se a metodologia GSEA (Subramanian et al., 2005), por meio da ferramenta *LinkInterpreter* existente na plataforma *Linkedomics*. Na ferramenta *LinkInterpreter*, selecionou-se o método GSEA e definiu-se como 3 o número mínimo de genes, 500 simulações e utilizou-se dados provenientes da plataforma *KEGG Pathway*, com $FDR < 0,01$.

3.1.2 Docking

O *docking* entre as proteínas DUSP1 e YAP1 foi realizado com a colaboração da Profa. Dra. Silvana Giuliatti no Laboratório de Bioinformática do Departamento de

Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Utilizou-se o servidor *ClusPro 2.0* para avaliar o *docking* direto entre as proteínas DUSP1 e YAP1 (Kozakova et al., 2017). A primeira etapa do *docking* foi realizada utilizando o programa PIPER que, por sua vez, é baseado na abordagem de correlação *Fast Fourier Transform* (FFT) (Kozakova et al., 2017). Brevemente, a primeira etapa desse processo consiste na análise de uma proteína fixada na grade de coordenadas (nesse caso, a DUSP1) enquanto a outra proteína (YAP1) é posicionada em uma grade móvel, possibilitando, assim, a análise da energia de interação por meio de uma função de correlação. Em seguida, as 1000 estruturas que representam os modelos mais prováveis do complexo são submetidas a um refinamento no qual são selecionadas as estruturas utilizando-se da minimização de energia. As estruturas cristalográficas de DUSP1 (6APX, cadeia A) e de YAP1 (6G8J, cadeia P) foram obtidas no banco de dados de proteína RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

A seleção do complexo que apresenta a interação mais forte foi realizada pelo cálculo da Área de Superfície Enterrada. Para a determinação dessa área assim como para a representação virtual do complexo, utilizou-se o *software* PyMol v.2.3.3.

3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas as linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 (ATCC[®] CRM-CRL-1420) e PANC-1 (ATCC[®] CRL-1469). As linhagens foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (Sigma Aldrich, Inc[®]) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB 12657 Gibco Laboratories, Invitrogen; pH 7.2–7.4), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Todas as linhagens foram autenticadas conforme critérios estabelecidos pela ATCC[®]. Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizada a solução de azul de Tripán (*Tripán blue* - Merck, Frankfurt, Alemanha), seguindo instruções do fabricante.

3.3 Modulação gênica de *DUSP1* e *DUSP6*

A indução da expressão de *DUSP6* e o *knockout* de *DUSP1* foram previamente realizados pelo grupo do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1. Para a indução da expressão de *DUSP6*, utilizou-se o kit Invitrogen[™] Clonase[™] Gateway LR, tendo como vetor de expressão o pLX304 e como vetor doador o vetor R777-E043 Hs.DUSP6 (Addgene[®]). O *knockout* de *DUSP1* foi realizado pela tecnologia CRISPR/Cas9. Foram utilizadas partículas lentivirais validadas (Sigma Aldrich, Inc[®];

LVCAS9BST - CAS9 *Blasticidin Lenti Particles*) para a expressão constitutiva da enzima Cas9 a partir do vetor LentiCas-Blast e o crRNA utilizado foram adquiridos na empresa *Dharmacon*[™] (G-CUSTOM-214951 - LP_18677 crRNA Cherry-pick Library) (tabela I). Tanto o vetor pLX304 quanto o vetor LentiCas-Blast continham como marcador de seleção o gene Blast^R que confere resistência à blasticidina. As células transduzidas foram selecionadas e posteriormente submetidas à expansão clonal a partir de célula única, por meio do método de diluição limitante.

Tabela I: Identificação da sequência do crRNA utilizado para a edição gênica da *DUSP1*, sequência PAM, localização genômica e o código de acesso da sequência.

Acesso	Sequência	PAM	Localização genômica	Éxon
NM_004417	CTGGACGGCGCCAAGCGCGA	CGG	hg38 chr5:172770654-172770676	Éxon 1

3.4 Ensaio de Citotoxicidade do composto BCI – IC₅₀

O valor de IC₅₀, cuja definição é a concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional das células em 50%, também foi determinado previamente pelo Laboratório de Oncologia Experimental, por meio do ensaio de citotoxicidade utilizando o reagente *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) (Sigma Aldrich, Inc[®]) conforme previamente descrito (Mosmann, 1983). A droga (E)-2-benzilideno-3-(ciclo-hexilamino)-2,3-di-hidro-1H-inden-1-ona (BCI) foi adquirida da empresa Sigma Aldrich[®] e diluída conforme recomendações do fabricante. Brevemente, 2,5x10⁴ células foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 horas foram submetidas ao tratamento nas dosagens de 1, 2.5, 5, 10, 25 e 50µM, e mantidas em condições de cultivo celular. Após os tempos de tratamento de 24, 48, 72 e 96h, adicionou-se 10µL do reagente MTT em cada poço, seguido de incubação por 4 horas. O composto MTT permite a identificação de células metabolicamente ativas a partir da sua clivagem por enzimas desidrogenases, resultando na produção do composto formazan, de coloração roxa. Após o período de incubação com MTT, ressuspendeu-se o formazan produzido por células metabolicamente ativas adicionando-se 100µL do composto dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância foi realizada no aparelho *Multiskan GO 51119300* (Thermo Fisher Scientific) com o comprimento de onda de 570nm. Os resultados de dois experimentos independentes realizados em triplicata foram utilizados para o cálculo do IC₅₀ utilizando o programa *Calculusyn* (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA).

Tabela II. Valores de IC₅₀ de BCI determinados para PANC-1 e MIA PaCa-2, no tempo de 48 horas.

Linhagens celulares	BCI (IC ₅₀)
PANC-1	4,7 µM
MIA PaCa-2	1,9 µM

3.5 Extração proteica

A extração de proteínas totais foi realizada utilizando o reagente *Rippa Buffer*® (Thermo Fisher Scientific) em conjunto com um coquetel inibidor de fosfatases e proteases. Após a adição do coquetel, as células foram submetidas a choque térmico por três vezes consecutivas e as proteínas foram coletadas após centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, realizou-se a quantificação das proteínas pelo método de Bradford, utilizando o kit *BioRad DC Protein Assay* (BioRad Lab, Inc.), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 Análise da expressão proteica

A análise de expressão proteica foi realizada pela técnica de *Western blotting*, que será detalhadamente descrita a seguir. As amostras de proteína foram acrescidas de tampão de amostra (*Laemmli Sample Buffer* – Bio-Rad Laboratories, Inc. #161-0737 e 2-Mercaptoetanol) na proporção de 1:1 e submetidas à desnaturação a 95°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram imediatamente submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, com o Buffer 1x *Tris/Glycine/SDS* (Bio-Rad Laboratories, Inc. #161-0732) a 100V por 2 horas. Em seguida, realizou-se a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose a 100V por 2 horas, utilizando o Buffer 1x *Tris/Glycine* (Bio-Rad Laboratories, Inc. #1610734). Após a transferência, a análise de sua eficiência foi realizada pela coloração da membrana com *Ponceau*. Uma vez verificada a correta transferência, realizou-se o bloqueio da membrana, utilizando a solução de 1X TBS-T com 5% de leite em pó desnatado, pelo período de uma hora em temperatura ambiente e sob leve agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight*, sob leve agitação a 4°C, com os anticorpos primários nas diluições apropriadas. Em seguida as membranas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS-T 1X. Posteriormente, os anticorpos secundários conjugados à enzima *horseradish* peroxidase foram incubados pelo período de 1 hora, sob leve agitação, em temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram novamente lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS-T 1X. A visualização das bandas

de proteínas foi possível por meio do emprego do substrato quimioluminescente *Clarity™ Western ECL Blotting Substrates* (GE Healthcare Life Sciences, US), utilizando o sistema de Imagens *ChemiDoc™ XRS+Image Lab™ Software* (BIO-RAD Laboratories, Inc.).

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-YAP1 (D8H1X #14074 – Cell Signaling Technology, Inc.), P-YAP1 (Ser127) (#13008 - Cell Signaling Technology, Inc), Vinculina (H-10 sc-25336 Santa Cruz Biotechnology) e β -actina (sc-47778 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-mouse e anti-rabbit, ambos adquiridos da empresa Agilent Technologies, Santa Clara, EUA.

3.7 Extração de RNA total

Após a coleta de pellets provenientes das linhagens, foram adicionados 500 μ L do reagente *Trizol Reagent Kit* (ThermoFisher Scientific, Invitrogen™) e homogeneizou-se cuidadosamente. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, seguido por agitação e incubação à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos, à 4°C. Após a recuperação da fase incolor, adicionou-se 500 μ L de isopropanol gelado e as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos, na temperatura de 4°C. Após a recuperação do precipitado, adicionou-se 1mL de etanol 75% sob agitação, seguido de centrifugação nas condições descritas anteriormente por 5 minutos. Após repetir três vezes a última etapa descrita, o sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. Por último, adicionou-se 20 μ L de água RNase free e quantificou-se o RNA no aparelho *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3.8 Síntese de cDNA e análise de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Para a análise da expressão gênica, sintetizou-se o cDNA a partir do RNA extraído, por meio do kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), de acordo com a recomendação do fabricante. Adiante, realizou-se a reação de RT-qPCR no aparelho *Step One Plus* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), utilizando o kit *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix* (#1725271 Bio-Rad Laboratories, Inc.) e primers adquiridos da empresa *Integrated DNA Technologies*,

Inc. (IDT) (Tabela III). Quantificou-se a expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen 2001). Como controle endógeno foram utilizados os genes *ACTB* e *GAPDH*.

Tabela III – Sequência dos *primers forward* e *reverse* utilizados para análise de expressão gênica

Gene	Sequência <i>Forward</i> (5'-3')	Sequência <i>Reverse</i> (5'-3')
<i>CTGF</i>	AATGCTGCGAGGAGTGGGT	CGGCTCTAATCATAGTTGGGTCT
<i>CYR61</i>	GAGTGGGTCTGTGACGAGGAT	GAGTGGGTCTGTGACGAGGAT
<i>ACTB</i>	TCGTGATGGACTCCGGTGAC	CGTGGTGGTGAAGCTGAG
<i>GAPDH</i>	AAGACGGGCGGAGAGAAACC	CGACCAAATCCGTTGACTCCG

3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Graph Prism 7* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). Foi utilizado o teste T de Student não-pareado para as análises de expressão gênica. Foram considerados significativos os resultados em que $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. DUSP6, DUSP7, DUSP10 e DUSP14 apresentam correlação com a via de sinalização Hippo

Para identificar a interação entre as DUSPs e as principais vias atuantes no ADP, realizou-se a análise de enriquecimento funcional de genes (GSEA) em 10 DUSPs típicas, as quais possuem o domínio para as proteínas fosfatases, sendo elas: DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5, DUSP6, DUSP7, DUSP8, DUSP9, DUSP10, DUSP16 e STYXL1. Utilizou-se dados públicos de RNASeq provenientes do banco TCGA por meio da plataforma *Linkedomics*.

A análise foi realizada pela ferramenta *LinkInterpreter*, com FDR (*false discovery rate*) < 0,01 e com 500 simulações estipuladas. Dentre as DUSPs analisadas, três DUSPs apresentam correlação com a via Hippo, sendo elas: *DUSP6*, *DUSP7* e *DUSP10* (Figura 3).

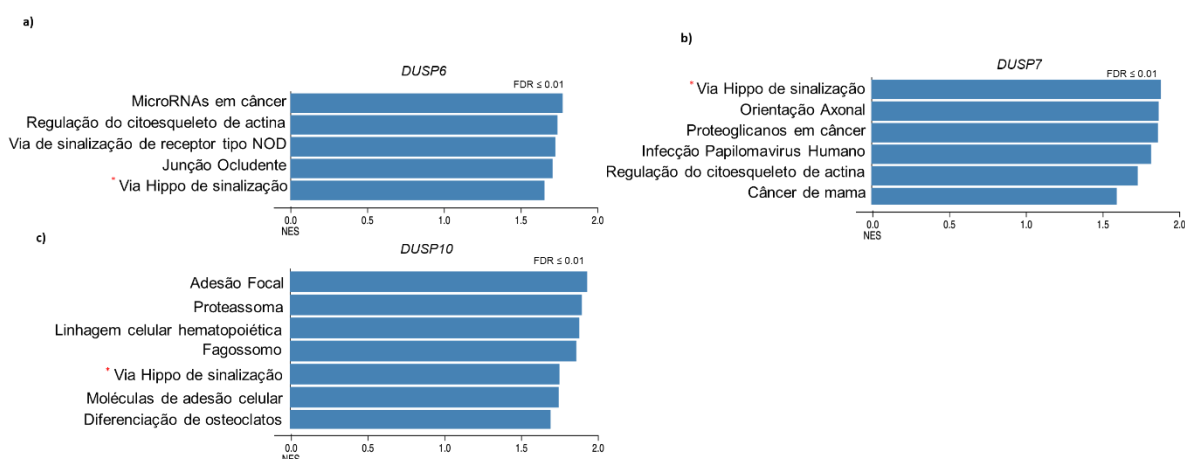


Figura 3: Análise *in silico* (GSEA) entre DUSPs e processos celulares. A Via Hippo está demarcada com um asterisco vermelho. Todos os dados apresentam FDR < 0,01.

Considerando que a DUSP6 consiste em uma das principais fosfatases investigadas nos mais diversos tumores e também em ADP (Ruckert et al., 2019), decidiu-se investigar essa fosfatase pela sua relevância descrita na literatura até o presente momento.

4.2. MIA PaCa-2 apresenta aumento na fosforilação de YAP1 em resposta ao tratamento com BCI

Para cumprir o objetivo de investigar os efeitos da modulação da DUSP6, na ativação de YAP1, optou-se, inicialmente, pela inibição farmacológica dessa fosfatase pelo inibidor específico BCI que tem como alvos a DUSP6 e DUSP1 (Molina et al.,

2009). O composto BCI é um inibidor alostérico, ou seja, o composto atua alojando-se no sítio ativo da enzima, impedindo o acoplamento do substrato e, assim, inibindo a atividade catalítica. Assim, a inibição farmacológica foi realizada nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. Foram utilizadas as concentrações de IC₅₀ de 48 horas de tratamento (1,9 μ M e 4,7 μ M, respectivamente) nos intervalos de tempo de 2, 6 e 24 horas.

Observou-se que a linhagem MIA PaCa-2 apresenta um notável aumento na fosforilação de YAP1 frente ao tratamento com BCI a partir do tempo de 2 horas de tratamento. Os tempos de 2 e 24 horas apresentaram aumento semelhante na fosforilação de YAP1, cerca de 4 vezes. O maior aumento da fosforilação de YAP1, 6 vezes, foi observado no tempo de 6 horas (Figura 4).

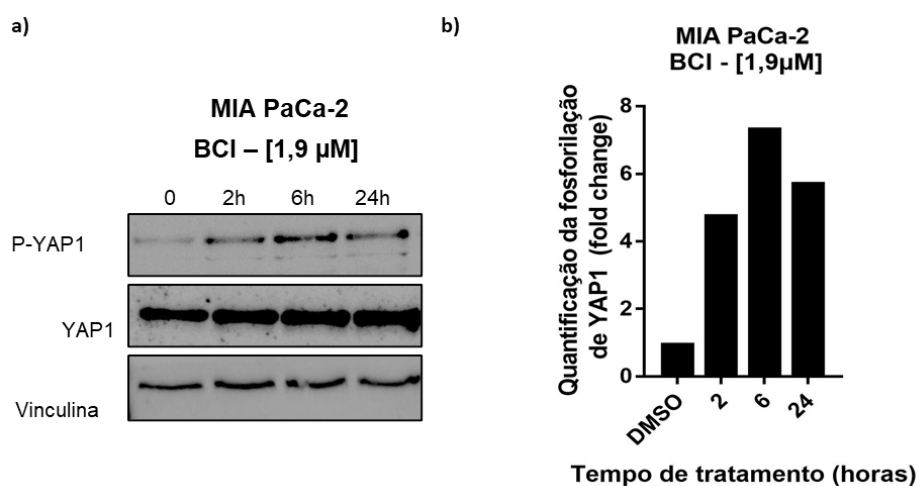


Figura 4. Expressão de P-YAP1, YAP1 e Vinculina na linhagem MIA PaCa-2 tratada com BCI nos tempos de 2, 6 e 24 horas. a) Representação da expressão proteica obtida por Western Blot. A linhagem MIA PaCa-2 apresenta alteração aparente na fosforilação de YAP1 frente ao tratamento com BCI. b) Gráfico da expressão proteica de P-YAP1 relativa a YAP1 e normalizada com o endógeno (Vinculina). A linhagem MIA PaCa-2 apresenta aumento na fosforilação de P-YAP1 nos tempos de 2, 6 e 24 horas de tratamento quando comparados ao controle DMSO.

Por fim, observou-se que a linhagem PANC-1 não apresenta alteração dos níveis de fosforilação de YAP1 frente à modulação de DUSP6 com o composto BCI (Figura 5).

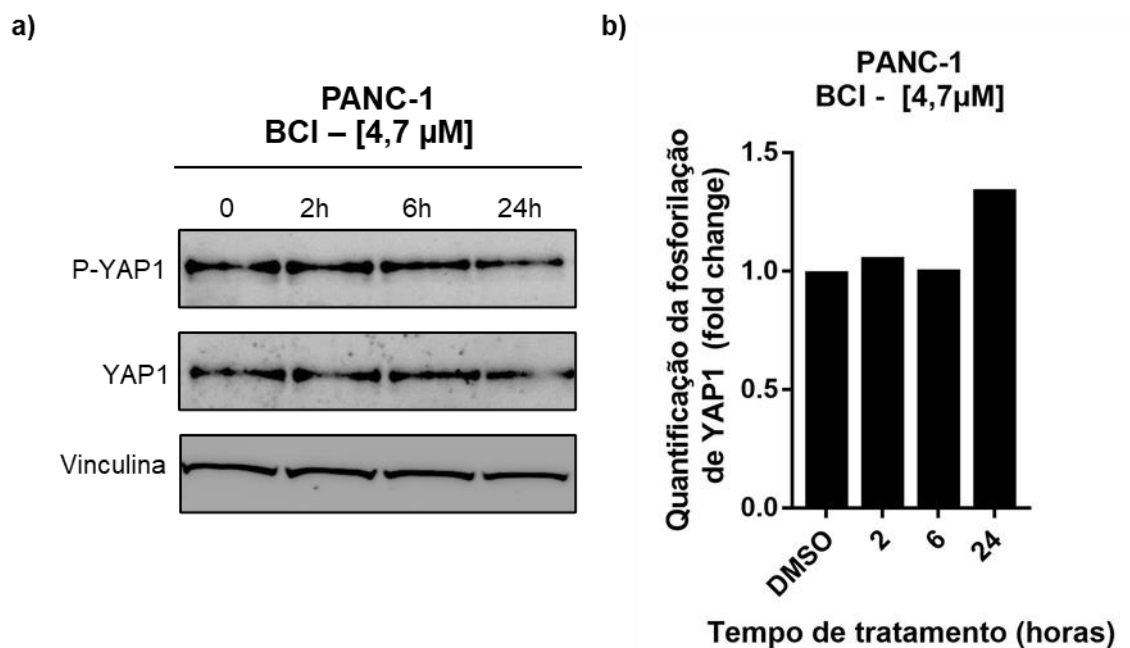


Figura 5: Expressão de P-YAP1, YAP1 e Vinculina na linhagem PANC-1 tratada com BCI. Tempos de tratamento: 2, 6 e 24 horas. a) Representação da expressão proteica obtida por Western Blot. A linhagem PANC-1 não apresenta alteração aparente na fosforilação de YAP1 frente ao tratamento com BCI. b) Gráfico da expressão proteica de P-YAP1 relativa a YAP1 e normalizada com o endógeno (Vinculina). A linhagem PANC-1 não apresenta alteração nos níveis de P-YAP1.

Diante dos resultados apresentados, sugere-se que a modulação de YAP1 por DUSP6 ocorra de maneira célula-dependente.

4.3. A indução da expressão de DUSP6 aumenta a fosforilação de YAP1

Considerando que a linhagem MIA PaCa-2 possui o promotor do gene *DUSP6* metilado (Xu et al., 2005), induziu-se a expressão de *DUSP6* nessa linhagem, pela tecnologia de vetor de expressão Gateway (pLX304-DUSP6), de modo a validar a atuação dessa fosfatase na modulação dos níveis de P-YAP1 anteriormente observada com o tratamento com BCI. Nesse contexto, esperava-se que o aumento da expressão de *DUSP6* resultasse na redução dos níveis de P-YAP1, porém, contraintuitivamente, observou-se que a indução da expressão de *DUSP6* acarretou em um aumento da fosforilação de YAP1 na linhagem MIA PaCa-2 (Figura 6).

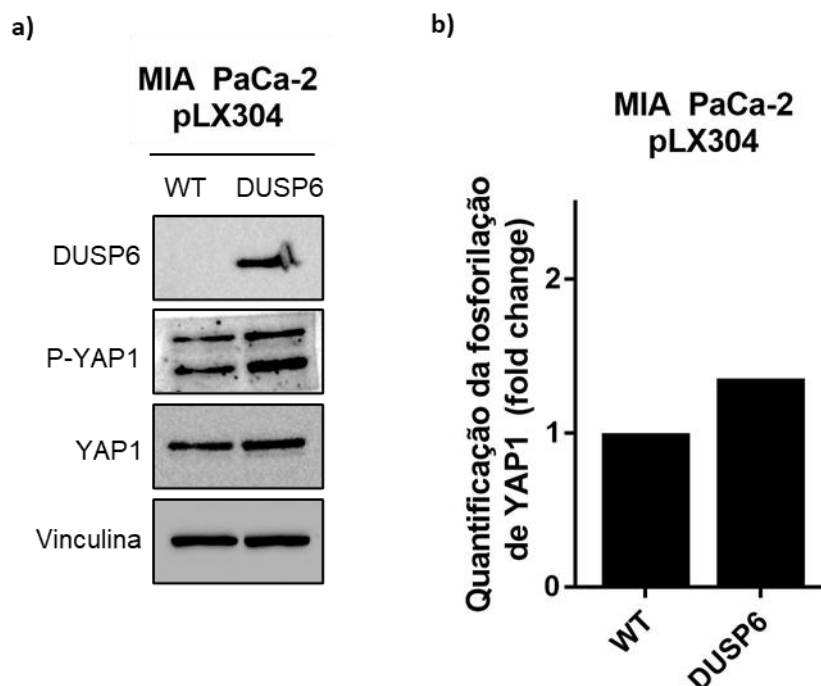


Figura 6: Representação da análise proteica de P-YAP1, YAP1, DUSP6, e Vinculina na linhagens MIA PaCa-2 pLX304 WT e MIA PaCa-2 pLX304-DUSP6. a) Western Blot. b) Expressão de P-YAP1 relativa à YAP1 e normalizada com o endógeno (Vinculina) nas linhagens MIA PaCa-2 WT e MIA PaCa-2 pLX304-DUSP6. A linhagem MIA PaCa-2 pLX304-DUSP6 apresentou aumento de P-YAP1 quando comparada com CTN .

O aumento na fosforilação de YAP1 frente a indução da expressão de DUSP6 vai de encontro à função de fosfatase dessa proteína. Dessa forma, questionou-se o papel de DUSP6 como fosfatase reguladora da fosforilação de YAP1.

4.4. DUSP1 é responsável pela modulação de P-YAP1 em MIA PaCa-2

Visto que foram observados resultados conflitantes na modulação de *DUSP6* em relação à fosforilação de YAP1, o presente estudo questionou se a alteração observada na fosforilação de YAP1 frente ao tratamento com BCI ocorre devido à inibição de DUSP1, dado que o inibidor atua tanto em DUSP6 quanto em DUSP1. Dessa forma, vislumbrou-se a possibilidade de que a alteração nos níveis de YAP1 observada no tratamento com BCI fosse devida à inibição de DUSP1, e não de DUSP6.

Para investigar essa possibilidade, utilizou-se uma linhagem MIA PaCa-2 com inibição gênica específica de *DUSP1*, por meio da técnica CRISPR/Cas9, para avaliar a fosforilação de YAP1. A análise proteica demonstrou que o *knockout* de *DUSP1* acarreta no aumento expressivo da fosforilação de YAP1 (5 vezes) quando comparado com a linhagem *wild type* (Figura 7).

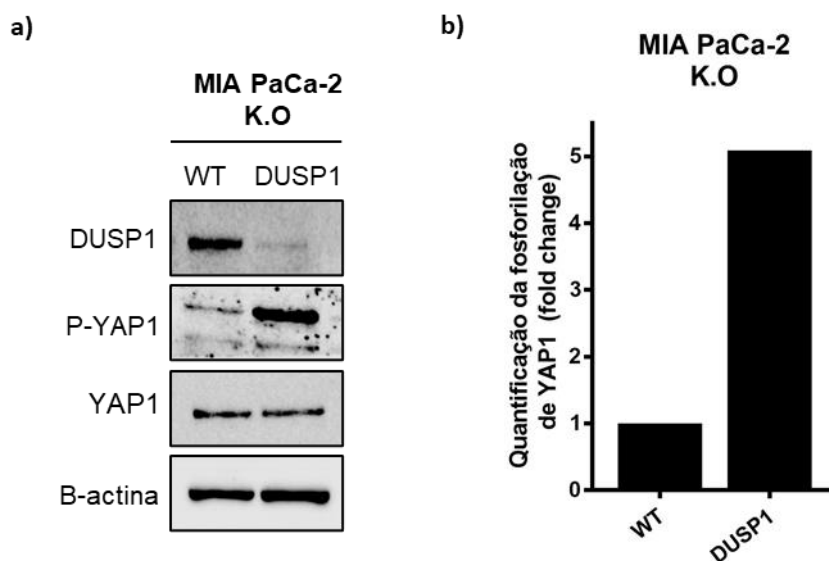


Figura 7: Representação da análise proteica de P-YAP1, YAP1, DUSP1, e β -actina nas linhagens MIA PaCa-2Cas9 e MIA PaCa-2 K.O DUSP1. a) Western Blot. b) Expressão de P-YAP1 relativa à YAP1 e normalizada com o endógeno (β -Actina) nas linhagens MIA PaCa-2 WT e MIA PaCa-2 K.O DUSP1. A Linhagem MIA PaCa-2 K.O DUSP1 apresentou aumento de P-YAP1 em 5 vezes quando comparada com a linhagem MIA PaCa-2 WT.

Esse resultado sugere que a modulação de P-YAP1 observada em MIA PaCa-2 tratada com BCI ocorre devido à inibição de DUSP1 e não devido à inibição de DUSP6.

4.5. DUSP1 e YAP1 formam um complexo estável *in silico*

Considerando os resultados anteriormente apresentados, o presente estudo questionou se a interação entre DUSP1 e YAP1 aconteceria de maneira direta ou por interação com proteínas *scaffold*. Dessa forma, utilizando-se do *software ClusPro 2.0*, realizou-se a análise da interação molecular entre DUSP1 e YAP1 a partir das estruturas cristalográficas obtidas da plataforma RCSB. Dentre os complexos resultantes, realizou-se a análise de Área de Superfície Enterrada pelo *software PyMol*. A representação da interação desse complexo também foi realizada pelo *software PyMol* e está representada na figura abaixo (Figura 8).

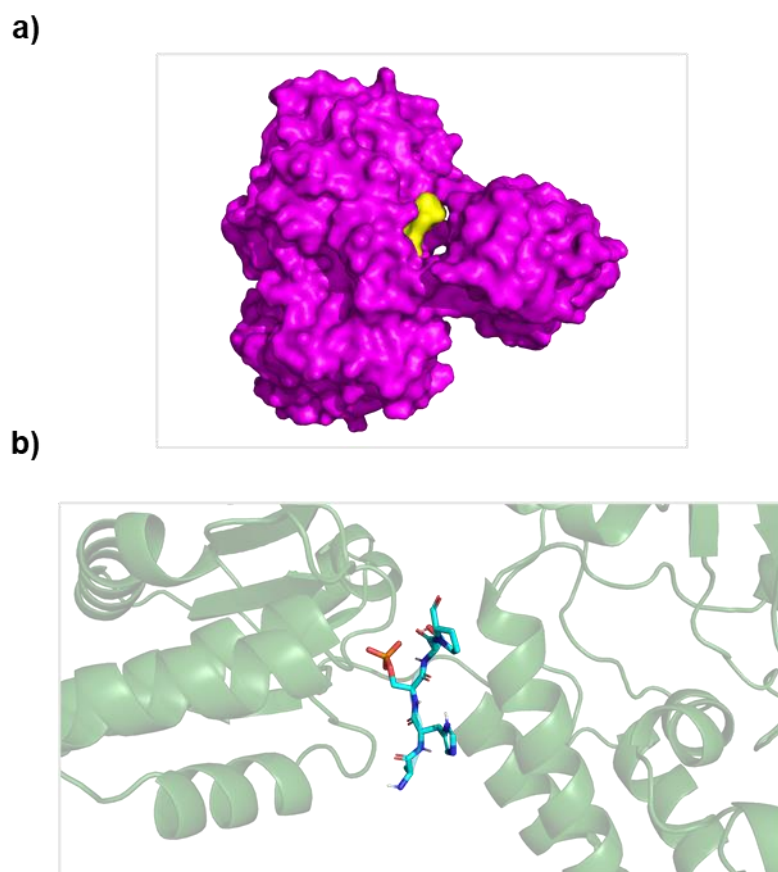


Figura 8: Docking entre as proteínas DUSP1 e YAP1. a) DUSP1 (magenta) e YAP1 (amarelo). **b)** Diagrama de fita do complexo DUSP1/YAP1.

Um dos complexos apresentou a maior Área de Superfície Enterrada (1125.37 Å²) sendo, assim, considerado o complexo mais estável dentre todos. A interação ocorreu entre o resíduo Ser127 da proteína YAP1 e o sítio ativo da proteína DUSP1.

4.6. A inibição de *DUSP1* modula alvo *downstream* de YAP1

Uma vez que a inibição de DUSP1 ocasionou o aumento da fosforilação de YAP1, questionou-se se os genes alvos de YAP1 também seriam afetados pela modulação dessa fosfatase. Sendo assim, foram realizadas análises de correlação *in silico* para avaliar se DUSP1 possui correlação com genes alvos de YAP1. Como resultado, observa-se que DUSP1 apresenta forte correlação positiva com *CTGF* e *CYR61* (R=0,73 p<0,0001 e R= 0,79; p<0,0001, respectivamente) (Figura 9).

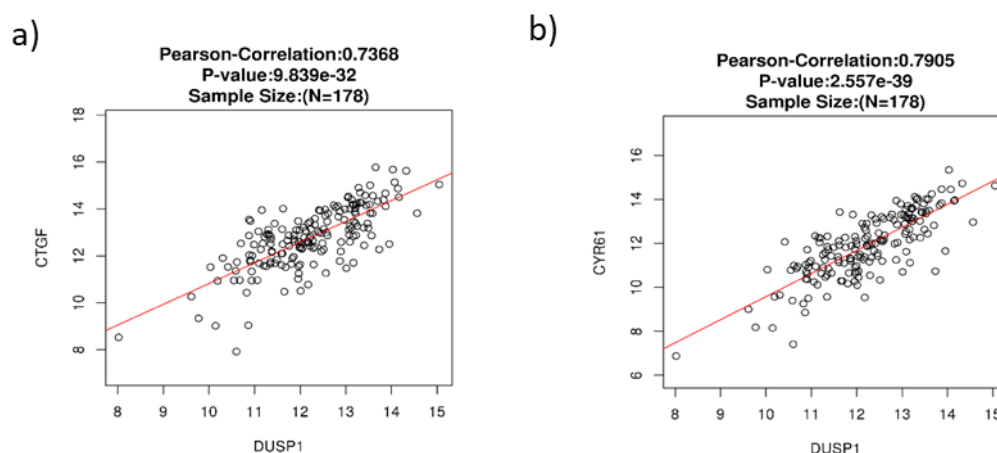


Figura 9: Análise in silico da correlação entre DUSP1 e genes alvos de YAP1. A análise da correlação de Pearson foi realizada utilizando dados de RNASeq de 178 amostras de tumor pancreático (banco de dados TCGA). **a)** CTGF e DUSP1 ($R = 0,73$; $p < 0,0001$); **b)** CYR61 e DUSP1 ($R = 0,79$; $p < 0,0001$).

Para validar os resultados obtidos nas análises *in silico*, realizou-se a análise da expressão de *CYR61* e *CTGF* no modelo MIA PaCa-2 com *knockout* de *DUSP1* por meio de RT-qPCR. A análise da expressão dos genes alvos de YAP1 demonstrou que o *knockout* de *DUSP1* reduz a expressão do gene *CTGF* em 12% ($p = 0,013$), mas não modula a expressão de *CYR61* ($p = 0,0122$), quando comparado com o controle negativo (Figura 10).

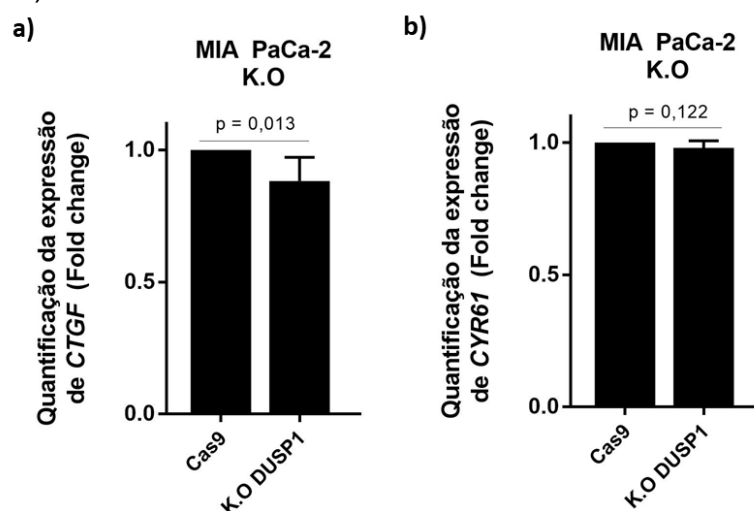


Figura 10: Análise da expressão gênica de alvos de YAP1 nas linhagens MIA PaCa-2^{Cas9} e MIA PaCa-2 K.O DUSP1. A expressão foi normalizada pelos endógenos GAPDH e B-actina. Utilizou-se o Teste t para a análise estatística. **a)** A expressão de *CTGF* tem redução de 12% na linhagem MIA PaCa-2 K.O *DUSP1* quando comparada com o controle ($p = 0,013$). **b)** Não é observada redução na expressão de *CYR61* na linhagem MIA PaCa-2 K.O *DUSP1* quando comparada com o controle ($p = 0,122$).

O resultado exposto valida parte dos resultados obtidos nas análises *in silico* e demonstra que *DUSP1* pode, de fato, atuar na modulação de YAP1 e em seu alvo downstream, *CTGF*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O cenário do Adenocarcinoma Ductal Pancreático resume-se em três pontos primordiais: primeiro, sua taxa de incidência é praticamente equivalente à taxa de mortalidade, resultando em uma sobrevida de 8%, segundo, os atuais quimioterápicos têm alto nível de toxicidade e aumentam pouco a sobrevida do paciente, e, por último, se nenhuma terapia efetiva for desenvolvida, o ADP está previsto como a segunda causa de morte por câncer no ano de 2030 (Agop Philip, 2002; Conroy et al., 2005; Siegel et al., 2018; Ueno et al., 2009). Esses três pontos são reflexo da capacidade de progressão tumoral do ADP, sustentada pela modulação de vias de sinalização que orquestram mecanismos essenciais para a homeostase tumoral. Inibidores específicos das proteínas quinases (ERK, JNK, p38) efectoras dessas vias são eventualmente superados, tomando, assim, imperiosa a busca e definição de novos biomarcadores (Morris et al., 2013). Nesse âmbito, as proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) têm ganhado ênfase na pesquisa por inativarem importantes vias de sinalização - ERK, JNK, p38, - que estão correlacionadas com funções como proliferação celular, resposta inflamatória, quimioresistência, dentre outras (Alam et al., 2015; Chen et al., 2000). Sendo assim, a identificação de novos substratos reconhecidos pelas DUSPs permitiria elucidar o mecanismo da manutenção do fenótipo tumoral exercido por essas fosfatases, possibilitando, então, a definição de novas estratégias terapêuticas para o ADP.

A análise de enriquecimento funcional de vias demonstrou que as DUSPs típicas 6, 7 e 10 apresentam a via Hippo entre as principais vias correlacionadas com essas fosfatases. Como previamente citado, a via Hippo desempenha importante função na manutenção do ADP por meio de YAP1. No ADP, YAP1 atua em processos como crescimento independente de ancoragem, proliferação celular, transição epitélio-mesenquimal, remodelamento do microambiente tumoral, quimioresistência, dentre diversos outros (Diep et al., 2012; Gujral & Kirschner, 2017; Jin et al., 2018; Lee, Jyioon; et al., 2015). A importância da molécula efectora da via Hippo no ADP também é confirmada pela extensão da expressão de YAP1, antes restrita às células ductais e centro acinares em tecido pancreático normal, para as ilhotas de Langherans e células esteladas no carcinoma *in situ* (Morvaridi et al., 2015). Sendo assim, descrever a possível interação entre DUSPs e YAP1 permitiria a compreensão dos mecanismos pelos quais ambas moléculas exercem efeitos na progressão tumoral do ADP.

Considerando o importante papel da DUSP6 como supressora de tumor e também como oncogene no ADP, o presente estudo utilizou o composto BCI para inibir a fosfatase selecionada nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1. Os resultados nos permitiram observar um aumento

expressivo na fosforilação de YAP1 na linhagem MIA PaCa-2, mas o mesmo não foi observado na linhagem PANC-1. Embora Diep e colaboradores demonstrem que o nível proteico de YAP1 em PANC-1 é elevado e semelhante ao encontrado em MIA PaCa-2 (Diep et al., 2012), Yang e colaboradores relatam que a expressão de YAP1 *wild type* em PANC-1 não é suficiente para alterar o fenótipo tumoral (migração e invasão) (Yang et al., 2015). No estudo de Yang e colaboradores, apenas as proteínas YAP1 constitutivamente ativadas por modificação *in vitro* foram capazes de induzir migração e invasão celular na linhagem PANC-1 (Yang et al., 2015). Por outro lado, Kapoor e colaboradores demonstraram que, em camundongos com ADP regredido pela depleção do gene KRAS^{G12D}, a recorrência tumoral é possível pela amplificação da região cromossômica 9qA1, resultando no aumento da expressão de 11 genes, e dentre eles, o efetor da via Hippo, YAP1. Ressalta-se, também, que ao verificar a expressão de *DUSP6* e *YAP1* nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 provenientes da enciclopédia *Cancer Cell Line* (CCLE), por meio da plataforma *depmap*, observa-se que a linhagem PANC-1 apresenta maior expressão tanto de *DUSP6* quanto de *YAP1* (4,58 e 6,72 respectivamente) em comparação com a linhagem MIA PaCa-2 (1,71 e 3,84, respectivamente) (Tsherniak et al., 2018). Esses resultados e as informações provenientes da literatura nos permite inferir que a inibição de *DUSP6* tem impacto reduzido na linhagem PANC-1, sugerindo, então, que a modulação de YAP1 mediada por DUSPs depende do contexto da linhagem celular.

Considerando que o composto BCI inibe tanto *DUSP6* quanto *DUSP1* e, também, que a linhagem MIA PaCa-2 apresenta o promotor do gene *DUSP6* com altos índices de metilação, realizou-se a indução da expressão de *DUSP6* na linhagem MIA PaCa-2 para compreender se o fenótipo observado no tratamento com BCI reflete a inibição de *DUSP6*, e não de *DUSP1* (Xu et al., 2005; Molina et al., 2009). Visto que ocorreu um aumento na fosforilação de YAP1 frente à indução da expressão de *DUSP6*, e considerando que esse aumento é contraditório devido à atividade de fosfatase da *DUSP6*, foi possível descartar a possibilidade da *DUSP6* ser responsável pela modulação de P-YAP1 em MIA PaCa-2 tratada com BCI.

Com o intuito de compreender o fenótipo observado na fosforilação de YAP1 frente a inibição farmacológica (BCI), utilizou-se um modelo de MIA PaCa-2 com inibição gênica específica de *DUSP1* para acessar os níveis de P-YAP1. Nesse caso, o aumento expressivo na fosforilação de YAP1 frente ao *knockout* de *DUSP1* sugere que *DUSP1* pode regular os níveis de fosforilação de YAP1. A *DUSP1* encontra-se altamente expressa em ADP, quando comparada com a expressão em pâncreas normal (Liao et al., 2003). A contribuição dessa fosfatase com o fenótipo do ADP foi ilustrada pela quimioresistência à Gemcitabina em linhagens (BxPC3 e COLO-37) com alta expressão de *DUSP1*. Nesse estudo, Liu e colaboradores

descrevem que DUSP1 inativa as mesmas vias que ativadas pela Gemcitabina, JNK e p38 (Liu et al., 2014). Em outro estudo, Liao e colaboradores demonstraram que DUSP1 atua na tumorigênese do ADP ao realizarem o *knockdown* de DUSP1 em modelo de camundongo nude e constatarem uma atenuação da tumorigênese (Liao et al., 2003).

Seria possível indagar se o aumento da fosforilação de P-YAP1, em resposta ao *knockout* e à inibição farmacológica de DUSP1, seria produto da interação entre os substratos reconhecidos por essa fosfatase - ERK, JNK e p38 - e a via de sinalização Hippo. Nesse caso, sabe-se que a inibição de DUSP1 acarreta na manutenção do estado ativo de JNK. Nesse âmbito, tem-se relatado na literatura, em células de osteosarcoma, câncer de mama e HEK293, que JNK possui a capacidade de fosforilar YAP1 para promover a apoptose, porém o mesmo ainda não foi testado em ADP (Tomlinson et al., 2010). De maneira oposta, em *Drosophila*, demonstrou-se que a expressão de JNK acarreta no acúmulo do gene ortólogo de YAP1, Yorkie, no núcleo celular (G. Sun & Irvine, 2011). Esse mecanismo é corroborado pelo estudo de Codelia e sua equipe, ao comprovarem que, na linhagem celular MCF10A, a ativação de JNK acarreta na ligação entre o LATS1 e seu inibidor, LIMD1, resultando na ativação de YAP1 (Codelia et al., 2014). No caso da quinase ERK1/2, You e colaboradores descreveram que a inibição dessa quinase com siRNA nas linhagens H1975, H2170 e A549 resulta na redução dos níveis proteicos de YAP1 (B. You et al., 2015). Sendo assim, para confrontar a possibilidade do aumento de P-YAP1 frente à inibição de DUSP1 ser resultado da atuação de seus alvos *downstream*, o presente estudo realizou *docking in silico* entre DUSP1 e YAP1.

Como citado anteriormente, o presente estudo questionou a viabilidade da interação direta entre DUSP1 e YAP1, assim como a estabilidade do complexo formado entre essas duas proteínas. Nessa conjuntura, observou-se que a interação entre DUSP1 e YAP1 é viável, estável e ocorreria entre o sítio ativo da fosfatase e o resíduo 127 de serina. Esse dado sugere que o fenótipo observado após a inibição de DUSP1 é resultado da interação entre essa fosfatase e YAP1, e que a regulação da fosforilação de YAP1 pela DUSP1 pode ocorrer por interação direta. Diversas fosfatases foram descritas como inibidoras da via Hippo, tendo como exemplo a fosfatase POPX2, capaz de inibir a molécula *upstream* LATS (Rahmat et al., 2019). Em células de câncer de pâncreas, tem-se descrito que uma subunidade reguladora da fosfatase PP2A, a PR55 α , é capaz de inibir a ativação de LATS por meio da degradação de MOB1 (Hein et al., 2019). A fosfatase PP2A também inibe a via Hippo por meio da desfosforilação direta de YAP1, relatado por Schlegelmilch e colaboradores (Schlegelmilch et al., 2011). Tem-se descrito também que a fosfatase PTPN14 liga-se à YAP1, impedindo sua internalização para o núcleo celular (Michaloglou et al., 2013). Com relação a interação entre DUSPs e YAP1, atualmente tem-se

apenas um trabalho descrevendo a interação entre DUSP10 e YAP1, em câncer colorretal (Jiménez-Martínez et al., 2019). Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a interação entre qualquer DUSP e YAP1 no contexto do câncer de pâncreas. Sendo assim, esse é o primeiro relato da possível interação entre DUSP1 e YAP1 em linhagem celular de ADP.

Visto que o *knockout* de *DUSP1* acarretou o aumento da fosforilação de YAP1, o presente estudo questionou se o efeito da inibição de DUSP1 poderia afetar também genes alvos de YAP1. Os resultados da expressão dos genes alvos de YAP1 demonstraram que o *knockout* de DUSP1 não altera significativamente a expressão de *CYR61*, mas resulta na inibição significativa da expressão do gene *CTGF* quando comparado com o controle. Ao verificar a expressão de ambos genes no portal *depmap*, na linhagem MIA PaCa-2, observa-se que a expressão de *CYR61* é 5 vezes superior à expressão de *CTGF* (5,64 e 1,55, respectivamente). Sendo assim, sugere-se o impacto da inibição de *DUSP1* na linhagem MIA PaCa-2 tem maior efeito no gene *CTGF* do que no gene *CYR61* devido à expressão basal desses genes. Esses dados confirmam, portanto, a correlação observada *in silico* entre os genes *DUSP1* e *CTGF*, e corroboram com a hipótese de que DUSP1 pode modular YAP1 na linhagem MIA PaCa-2.

Em suma, os resultados obtidos por esse estudo demonstram, pela primeira vez na literatura, que DUSP1 atua na desfosforilação de YAP1 na linhagem MIA PaCa-2. Demonstrou-se que essa interação é viável, estável, e que a DUSP1 tem como alvo o resíduo de serina127 em YAP1. Não somente, a inibição de *DUSP1* afeta o gene alvo de YAP1, *CTGF*. Outros estudos são necessários para melhor compreender e confirmar a interação entre DUSP1 e YAP1. A continuação desse estudo possibilitaria uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais DUSP1 e YAP1 atuam na progressão tumoral de ADP, podendo, futuramente, colaborar com a definição de um novo alvo nas terapias desse tumor agressivo.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- As análises *in silico* demonstraram que DUSP6 e DUSP1 apresentavam potencial como reguladoras da via de sinalização Hippo;
- A inibição de DUSP1 e DUSP6, por meio do composto BCI, induziu o aumento da fosforilação de YAP1 na linhagem MIA PaCa-2, porém não afetou a fosforilação de YAP1 na linhagem PANC-1;
- A indução da expressão de *DUSP6* na linhagem MIA PaCa-2 aumentou os níveis de fosforilação de YAP1;
- O *knockout* de *DUSP1* na linhagem MIA PaCa-2 resultou no aumento da fosforilação de YAP1;
- O *docking in silico* de DUSP1 e YAP1 demonstrou que há viabilidade de interação entre as proteínas, as quais formam um complexo estável;
- O *knockout* de *DUSP1* reduziu a expressão do gene *CTGF*, mas não alterou a expressão do gene *CYR61*.

Referências Bibliográficas

- Agop Philip, P. (2002). Gemcitabine and platinum combinations in pancreatic cancer. *Cancer*, 95(S4), 908–911. <https://doi.org/10.1002/cncr.10757>
- Alam, M. S., Gaida, M. M., Bergmann, F., Lasitschka, F., Giese, T., Giese, N. A., Hackert, T., Hinz, U., Hussain, S. P., Kozlov, S. V., & Ashwell, J. D. (2015). Selective inhibition of the p38 alternative activation pathway in infiltrating T cells inhibits pancreatic cancer progression. *Nature Medicine*, 21(11), 1337–1343. <https://doi.org/10.1038/nm.3957>
- Alonso, Andrés, & Pulido, R. (2016). The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS Journal*, 283, 2197–2201. <https://doi.org/10.1111/febs.13748>
- Alonso, Andres, Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T., Jolla, L., & Jolla, L. (2004). *in the Human Genome*. 117, 699–711.
- Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897–909. <https://doi.org/10.1038/nrc949>
- Bermudez, O., Pagès, G., & Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: Critical roles in development and cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00347.2009>
- Boggiano, Julian C.; Vanderzalm, Pamela J.; Fehon, R. G. (2011). Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST kinases to Regulate the Hippo- Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev Cell.*, 21(5), 888–895. <https://doi.org/doi:10.1016/j.devcel.2011.08.028>
- Braschi, B., Denny, P., Gray, K., Jones, T., Seal, R., Tweedie, S., Yates, B., & Bruford, E. (2019). Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D786–D792. <https://doi.org/10.1093/nar/gky930>
- Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., & Der, C. J. (2014). KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- Callus, B. A., Verhagen, A. M., & Vaux, D. L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS Journal*, 273(18), 4264–4276. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x>
- Camargo, F. D., Gokhale, S., Johnnidis, J. B., Fu, D., Bell, G. W., Jaenisch, R., & Brummelkamp, T. R. (2007). YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology*, 17(23), 2054–2060. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.039>
- Cancer, P., & Watanabe, M. (1995). ODAC recommends full approval for Gemzar for pancreatic cancer. *Oncology (Williston Park)*, 9(9), 799–800.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562322>
- Chen, G., Hitomi, M., Han, J., & Stacey, D. W. (2000). *The p38 Pathway Provides Negative Feedback for Ras Proliferative Signaling*. *Cell*, *275*(50), 38973–38980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002856200>
- Clark, C. E., Hingorani, S. R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D. A., & Vonderheide, R. H. (2007). Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Research*, *67*(19), 9518–9527. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0175>
- Codelia, V. A., Sun, G., & Irvine, K. D. (2014). Regulation of YAP by mechanical strain through Jnk and Hippo signaling. *Current Biology*, *24*(17), 2012–2017. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.034>
- Colucci, G., Giuliani, F., Gebbia, V., Biglietto, M., Rabitti, P., Uomo, G., Cigolari, S., Testa, A., Maiello, E., & Lopez, M. (2002). Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma. *Cancer*, *94*(4), 902–910. <https://doi.org/10.1002/cncr.10323>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-bourgade, S., Fouchardière, C. De, Assenat, E., Chauffert, B., Ph, D., Michel, P., Montoto-grillot, C., Chem, M., & Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *Nejm*, 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Conroy, T., Paillot, B., François, E., Bugat, R., Jacob, J. H., Stein, U., Nasca, S., Metges, J. P., Rixe, O., Michel, P., Magherini, E., Hua, A., & Deplanque, G. (2005). Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin-modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer - A Groupe Tumeurs Digestives of the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer study. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(6), 1228–1236. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.050>
- De Sousa Cavalcante, L., & Monteiro, G. (2014). Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European Journal of Pharmacology*, *741*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.041>
- Denu, J. M., & Dixont, J. E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, *2*(X), 633–641. <http://biomednet.com/elecref/13675>
- Dickinson, R. J., Williams, D. J., Slack, D. N., Williamson, J., Seternes, O. M., & Keyse, S. M. (2002). Characterization of a murine gene encoding a developmentally regulated cytoplasmic dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase. *Biochemical Journal*, *364*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1042/bj3640145>
- Diep, C. H., Zucker, K. M., Hostetter, G., Watanabe, A., Hu, C., Munoz, R. M., von Hoff, D. D., & Han, H. (2012). Down-regulation of yes associated protein 1 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, *7*(3), 1–9.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032783>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*, 2014(Figure 2). <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Edalat, F. (2012). *NIH Public Access*. 40(6), 1301–1315. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0452-9>.Engineering
- Farooq, A., & Zhou, M. M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. In *Cellular Signalling* (Vol. 16, Issue 7, pp. 769–779). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.12.008>
- Glantschnig, H., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2002). Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation: Activation and autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42987–42996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208538200>
- Gujral, T. S., & Kirschner, M. W. (2017). Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), E3729–E3738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703096114>
- Hayes, Tikvah K; Neel, Nicole F; Hu, Chaoxin Hu; Gautam, Prso; Chenard, M. (2017). Long-term ERK Inhibition in KRAS-mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Hein, A. L., Brandquist, N. D., Ouellette, C. Y., Seshacharyulu, P., Enke, C. A., Ouellette, M. M., Batra, S. K., & Yan, Y. (2019). PR55 α regulatory subunit of PP2A inhibits the MOB1/LATS cascade and activates YAP in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 8(11), 13. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0172-9>
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J. A., Shimizu, M., & Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*, 28(8), 977–987. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000126675.59108.80>
- Huang, D., Fang, J., & Luo, G. (2016). Meta-analysis of gemcitabine and cisplatin combination chemotherapy versus gemcitabine alone for pancreatic cancer. In *Journal of Cancer Research and Therapeutics* (Vol. 12, Issue 5, p. 104). <https://doi.org/10.4103/0973-1482.191616>
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., & Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell*, 122(3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.007>

- J . Han , J . -D . Lee, L . B. and R . J. (1994). *A MAP Kinase Targeted by Endotoxin and Hyperosmolarity in Mammalian Cells Author*. 265(5173), 808–811.
- Jiménez-Martínez, M., Ostalé, C. M., van der Burg, L. R., Galán-Martínez, J., Hardwick, J. C. H., López-Pérez, R., Hawinkels, L. J. A. C., Stamatakis, K., & Fresno, M. (2019). DUSP10 is a regulator of YAP1 activity promoting cell proliferation and colorectal cancer progression. *Cancers*, 11(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers11111767>
- Jin, M. Z., Han, R. R., Qiu, G. Z., Ju, X. C., Lou, G., & Jin, W. L. (2018). Organoids: An intermediate modeling platform in precision oncology. *Cancer Letters*, 414, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.021>
- Kidger, A. M., & Keyse, S. M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 50, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.01.009>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., Vecchia, C. La, & Johnson, C. D. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Publishing Group*, 2(April), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Klein, A. P., Brune, K. A., Petersen, G. M., Goggins, M., Tersmette, A. C., Offerhaus, G. J., Griffin, C., Cameron, J. L., Yeo, C. J., Kern, S., & Hruban, R. H. (2004). Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Research*, 64(7), 2634–2638. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3823>
- Kozakova, D., Hallc, D. R., , Bing Xiab, Kathryn A. Porterb, D. P., & Christine Yuehb, Dmitri Beglovb, and S. V. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Physiology & Behavior*, 12(2), 255–278. <https://doi.org/doi:10.1038/nprot.2016.169>
- Lee, Jyioon; Condello, Salvatore; Bakhtiyor, Yakubov; Emerson, R. (2015). Tissue Transglutaminase Mediated Tumor-Stroma Interaction Promotes Pancreatic Cancer Progression. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4482–4493. <https://doi.org/doi:10.1158/1078-0432>
- Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., & Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncology Letters*, 12(5), 3045–3050. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5110>
- Liao, Q., Guo, J., Kleeff, J., Zimmermann, A., Büchler, M. W., Korc, M., & Friess, H. (2003). Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*, 124(7), 1830–1845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00398-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00398-6)
- Lin, S. C., Chien, C. W., Lee, J. C., Yeh, Y. C., Hsu, K. F., Lai, Y. Y., Lin, S. C., & Tsai, S. J. (2011). Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1905–1916. <https://doi.org/10.1172/JCI44362>
- Liu, F., Gore, A. J., Wilson, J. L., & Korc, M. (2014). DUSP1 Is a novel target for enhancing

- pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS ONE*, 9(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084982>
- Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2006). Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 20(2), 197–209.
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.10.001>
- Maillet, M., Purcell, N. H., Sargent, M. A., York, A. J., Bueno, O. F., & Molkenin, J. D. (2008). DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 31246–31255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806085200>
- Mandl, M., Slack, D. N., & Keyse, S. M. (2005). Specific Inactivation and Nuclear Anchoring of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 by the Inducible Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP5. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1830–1845.
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.5.1830-1845.2005>
- Margolis, Ben; Skolnik, V. E. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *New York*, 5, 1288–1299.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263–1284.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
- Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes and Development*, 30(1), 1–17. <https://doi.org/10.1101/gad.274027.115>
- Messina, S., Frati, L., Leonetti, C., Zuchegna, C., Di Zazzo, E., Calogero, A., & Porcellini, A. (2011). Dual-specificity phosphatase DUSP6 has tumor-promoting properties in human glioblastomas. *Oncogene*, 30(35), 3813–3820. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.99>
- Michaloglou, C., Lehmann, W., Martin, T., Delaunay, C., Hueber, A., Barys, L., Niu, H., Billy, E., Wartmann, M., Ito, M., Wilson, C. J., Digan, M. E., Bauer, A., Voshol, H., Christofori, G., Sellers, W. R., Hofmann, F., & Schmelzle, T. (2013). The Tyrosine Phosphatase PTPN14 Is a Negative Regulator of YAP Activity. *PLoS ONE*, 8(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061916>
- Molina, G., Vogt, A., Bakan, A., Dai, W., De, P. Q., Znosko, W., Smithgall, T. E., Bahar, I., Lazo, J. S., & Billy, W. (2009). *Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages*. 5(9), 680–687.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.190.Zebrafish>
- Moroishi, T., Park, H. W., Qin, B., Chen, Q., Meng, Z., Plouffe, S. W., Taniguchi, K., Yu, F. X., Karin, M., Pan, D., & Guan, K. L. (2015). A YAP/TAZ-induced feedback mechanism

- regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes and Development*, 29(12), 1271–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.262816.115>
- Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., DiNunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., ... Samatar, A. A. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discovery*, 3(7), 742–750. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0070>
- Morvaridi, S., Dhall, D., Greene, M. I., Pandol, S. J., & Wang, Q. (2015). Role of YAP and TAZ in pancreatic ductal adenocarcinoma and in stellate cells associated with cancer and chronic pancreatitis. *Scientific Reports*, 5(November), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep16759>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murakami, S., Shahbazian, D., Surana, R., Zhang, W., Chen, H., Graham, G. T., White, S. M., Weiner, L. M., & Yi, C. (2017). Yes-Associated protein mediates immune reprogramming in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 36(9), 1232–1244. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.288>
- Noë, M., & Brosens, L. A. A. (2016). Pathology of Pancreatic Cancer Precursor Lesions. *Surgical Pathology Clinics*, 9(4), 561–580. <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.05.004>
- Ouyang, G., Liu, Z., Huang, S., Li, Q., Xiong, L., Miao, X., & Wen, Y. (2016). Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine alone in the treatment of pancreatic cancer: A meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0813-9>
- Patterson, K. I., Brummer, T., Brien, P. M. O., & Daly, R. J. (2010). *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets*. 489(2009), 475–489. <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>
- Peddi, P. F., Lubner, S., McWilliams, R., Tan, B. R., Picus, J., Sorscher, S. M., Suresh, R., Craig Lockhart, A., Wang, J., Menias, C., Gao, F., Linehan, D., & Wang-Gillam, A. (2012). Multi-institutional experience with FOLFIRINOX in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of the Pancreas*, 13(5), 497–501.
- Rahmat, M. B., Zhang, S., & Koh, C. G. (2019). POPX2 is a novel LATS phosphatase that regulates the Hippo pathway. *Oncotarget*, 10(15), 1525–1538. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26689>
- Ramos, A., & Camargo, F. D. (2012). The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends in Cell Biology*, 22(7), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.006>
- Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., Robertson,

- A. G., Cherniack, A. D., Gupta, M., Getz, G., Gabriel, S. B., Meyerson, M., Cibulskis, C., Fei, S. S., Hinoue, T., Shen, H., Laird, P. W., Ling, S., Lu, Y., ... Zenklusen, J. C. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 32(2), 185-203.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>
- Rhim, A. D., & Stanger, B. Z. (2010). Molecular Biology of PDAC Progression: Aberrant Activation of Developmental Pathways. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 97, Issue Table I). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00002-7>.Molecular
- Ruckert, M. T., de Andrade, P. V., Santos, V. S., & Silveira, V. S. (2019). Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 13, pp. 2571–2592). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03095-4>
- Sato, T., Shibata, W., Hikiba, Y., Kaneta, Y., Suzuki, N., Ihara, S., Ishii, Y., Sue, S., Kameta, E., Sugimori, M., Yamada, H., Kaneko, H., Sasaki, T., Ishii, T., Tamura, T., Kondo, M., & Maeda, S. (2017). c-Jun N-terminal kinase in pancreatic tumor stroma augments tumor development in mice. *Cancer Science*, 108(11), 2156–2165. <https://doi.org/10.1111/cas.13382>
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., Kreger, B. T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T. R., & Camargo, F. D. (2011). Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 782–795). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.031>
- Shapiro, L., & Dinarello, C. A. (1995). Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12230–12234. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12230>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Silva, I. de C. da; (2018). No title [Internet]. <https://doi.org/http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., & Ebert, B. L. (2005). *Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide*.
- Sun, G., & Irvine, K. D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors.

- Developmental Biology*, 350(1), 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.036>
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., & Tonks, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 75(3), 487–493. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90383-2)
- Tomlinson, V., Gudmundsdottir, K., Luong, P., Leung, K. Y., Knebel, A., & Basu, S. (2010). JNK phosphorylates Yes-associated protein (YAP) to regulate apoptosis. *Cell Death and Disease*, 1(2), e29-9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.7>
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Weir, B. A., Kryukov, G., Cowley, G. S., Gill, S., Harrington, W. F., Krill-burger, J. M., Meyers, R. M., Ali, L., Goodale, A., Lee, Y., Jiang, G., Hsiao, J., Gerath, W. F. J., Howell, S., Merkel, E., Garraway, L. A., ... Hahn, W. C. (2018). *Defining a Cancer Dependency Map*. 170(3), 564–576. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>. Defining
- Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., Doi, R., Monden, M., Hatori, T., Tanaka, M., Shimada, M., & Kanemitsu, K. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *British Journal of Cancer*, 101(6), 908–915. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605256>
- Villeneuve, PJ; Jhonson, KC; A J G Hanley; Mao, Y. (2000). *alcohol tobacco and coffee consumption and the risk of pancreatic cancer.pdf* (pp. 49–58). European Journal of Cancer Prevention.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791), 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Wang, D., Han, S., Peng, R., Jiao, C., Wang, X., Han, Z., & Li, X. (2014). DUSP28 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulation of the p38 MAPK signaling. *International Journal of Oncology*, 45(6), 2596–2604. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2653>
- Wei, H., Xu, Z., Liu, F., Wang, F., Wang, X., Sun, X., & Li, J. (2017). Hypoxia induces oncogene Yes-Associated protein 1 nuclear translocation to promote pancreatic ductal adenocarcinoma invasion via Epithelial-Mesenchymal transition. *Tumor Biology*, 39(5). <https://doi.org/10.1177/1010428317691684>
- Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., Hsiao, K. M., Chou, S. Y., Shih, S. J., Ferrell, J. E., Fukuda, M., Gotoh, Y., Nishida, E., Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E., McCubrey, J. A., Engel, K., Kotlyarov, A., Gaestel, M., Chang, L., ... Woodgett, J. R. (1998). p-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT- and ERK-dependent activation of NF-κB pathway. *Nature*, 20(12), 2223–2240. <https://doi.org/10.1038/369156a0>
- Wu, J. J., Roth, R. J., Anderson, E. J., Hong, E. G., Lee, M. K., Choi, C. S., Neuffer, P. D.,

- Shulman, G. I., Kim, J. K., & Bennett, A. M. (2006). Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 4(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.010>
- Wu, W., Pew, T., Zou, M., Pang, D., & Conzen, S. D. (2005). Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4117–4124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411200200>
- Xia, Z., Dickens, M., Raugeaud, J., Davis, R. J., & Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240), 1326–1331. <https://doi.org/10.1126/science.270.5240.1326>
- Xu, S., Furukawa, T., Kanai, N., Sunamura, M., & Horii, A. (2005). Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of Human Genetics*, 50(4), 159–167. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0235-y>
- Yachida, Shinichi; Jones, Siân; Bozic, Ivana; Antal, Tibor; Leary, R. (2010). *Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer*. 467(7319), 1114–1117. <https://doi.org/10.1038/nature09515>. Distant
- Yang, S., Zhang, L., Purohit, V., Shukla, S. K., Chen, X., Yu, F., Fu, K., Chen, Y., Solheim, J., Singh, P. K., Song, W., & Dong, J. (2015). Active YAP promotes pancreatic cancer cell motility, invasion and tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner through LPAR3. *Oncotarget*, 6(34). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5935>
- You, B., Yang, Y. L., Xu, Z., Dai, Y., Liu, S., Mao, J. H., Tetsu, O., Li, H., Jablons, D. M., & You, L. (2015). Inhibition of ERK1/2 down-regulates the Hippo/YAP signaling pathway in human NSCLC cells. *Oncotarget*, 6(6), 4357–4368. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2974>
- You, L., Ren, X., Du, Y., Zhao, W., Cui, M., Chen, G., & Zhao, Y. (2016). C-Fos/ERK promotes the progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology Reports*, 36(6), 3413–3420. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5169>
- Yu, F. X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S. S., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes and Development*, 27(11), 1223–1232. <https://doi.org/10.1101/gad.219402.113>
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., & Bogoyevitch, M. A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 793–835. <https://doi.org/10.1128/mmb.00043-14>
- Zhang, W., Nandakumar, N., Shi, Y., Manzano, M., Smith, A., Gupta, S., Vietsch, E. E., Laughlin, S. Z., Wadhwa, M., Chetram, M., Joshi, M., Wang, F., Kallakury, B., & Toretsky,

- J. (2014). Downstream of Mutant KRAS, the Transcription Regulator YAP Is Essential for Neoplastic Progression to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Signal*, 7(324). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005049.Downstream>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes and Development*, 21(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J. D., Wang, C. Y., Chinnaiyan, A. M., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes and Development*, 22(14), 1962–1971. <https://doi.org/10.1101/gad.1664408>
- Zhong, Y., Naito, Y., Cope, L., Naranjo-Suarez, S., Saunders, T., Hong, S. M., Goggins, M. G., Herman, J. M., Wolfgang, C. L., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2014). Functional p38 MAPK identified by biomarker profiling of pancreatic cancer restrains growth through JNK inhibition and correlates with improved survival. *Clinical Cancer Research*, 20(23), 6200–6211. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2823>